



ΟΡΟΛΟΓΙΑ – ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΘΕΩΡΙΑΣ

ΑΓΑΡ: Είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από γαλακτόζη και γαλακτουρικό οξύ και προέρχεται συνήθως από ερυθροφύκη. Χρησιμοποιείται ως βάση για την παρασκευή στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων για την καλλιέργεια μικροοργανισμών. Βασικά του πλεονεκτήματα είναι ότι υγροποιείται σε θερμοκρασία 80-90°C και έτσι μπορεί εύκολα να απλωθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες και τρυβλία, ενώ στερεοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ένα επιπλέον πλεονέκτημά του είναι ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν το αποικοδομούν.

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ: Είναι οποιοδήποτε μικροβιακό προϊόν το οποίο σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να παρεμποδίσει την αύξηση ή να σκοτώσει άλλους μικροοργανισμούς. Γενικότερα με τον όρο αυτό αναφερόμαστε σε οποιοδήποτε φυσικό, ημι-συνθετικό ή πλήρως συνθετικό αντιμικροβιακό παράγοντα, ο οποίος είναι δραστικός σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα αντιβιοτικά δρουν αναστέλλοντας ή παρεμποδίζοντας κάποια ειδική βιοχημική αντίδραση του μικροοργανισμού.

Η ανάπτυξη των αντιβιοτικών ως θεραπευτικών μέσων ενάντια στα λοιμώδη νοσήματα αποτέλεσε επανάσταση για την Ιατρική, η οποία ήταν πλέον σε θέση να θεραπεύσει την ανθρωπότητα από τις επιδημίες που την αποδεκάτιζαν.

Ωστόσο, δεν είναι όλα τα αντιβιοτικά κατάλληλα να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά μέσα. Ένα αντιβιοτικό είναι κατάλληλο ως θεραπευτικό μέσο όταν είναι τοξικό μόνο για τον παθογόνο μικροοργανισμό. Υπάρχουν πολλά αντιβιοτικά που είναι τοξικά για τον άνθρωπο ή τα ζώα.

Τα αντιβιοτικά είναι μεταβολίτες που παράγονται από τους μικροοργανισμούς κατά τη στατική φάση (δευτερογενείς μεταβολίτες).

Για τη βιομηχανική παραγωγή των αντιβιοτικών χρησιμοποιούνται κυρίως πολυκύτταροι μύκητες (υφομήκες) π.χ. του γένους *Penicillium* και βακτήρια κυρίως της ομάδας των ακτινομυκήτων και κυρίως του γένους *Streptomyces*. Από τη στιγμή που ένα αντιβιοτικό ανακαλυφθεί, γίνει γνωστή η χημική δομή του και η ιατρική του εφαρμογή, δοκιμάζεται σε πειραματόζωα και γίνεται έλεγχος τοξικότητας. Τελικά, αφού περάσει τις κλινικές δοκιμές (πρόκειται μια σειρά διαδοχικών σταδίων τα οποία συνήθως διαρκούν κάποια



χρόνια), το αντιβιοτικό παίρνει έγκριση για βιομηχανική παραγωγή και εμπορία. Η παραπάνω διαδικασία είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και πολυέξοδη.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ: Είναι η διαδικασία κατά την οποία ένας μικροοργανισμός που πρόκειται να καλλιεργηθεί, απομονώνεται σε καθαρή καλλιέργεια από άλλους ετερόκλητους μικροοργανισμούς με τους οποίους διαβιώνει υπό φυσιολογικές συνθήκες στο περιβάλλον.

ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ: Είναι μία αντιμικροβιακή μέθοδος με την οποία θανατώνονται ή απομακρύνονται όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί και οι ιοί τους από ένα θρεπτικό μέσο.

Η αποστείρωση είναι δυνατόν να επιτευχθεί είτε με φυσικές μεθόδους είτε με χημικές μεθόδους είτε με συνδυασμό και των δύο.

Στις φυσικές μεθόδους περιλαμβάνονται:

- Η θερμική αποστείρωση. Η θερμική αποστείρωση με ατμό είναι απόλυτη αντιμικροβιακή μέθοδος. Με εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (121°C) και πίεσης ($1,1 \text{ kg/cm}^2$) για 15 λεπτά θανατώνονται ακόμη και τα ενδοσπόρια των βακτηρίων!
- Η ακτινοβολήση, είτε με ιονίζουσα ακτινοβολία είτε με μικροκύματα είτε με υπεριώδη ακτινοβολία.
- Η διήθηση.
- Οι υπέρηχοι.

Στις χημικές μεθόδους αποστείρωσης περιλαμβάνεται η χρήση διαφόρων χημικών ουσιών που θανατώνουν τους μικροοργανισμούς ή τους προκαλούν παρεμπόδιση της αύξησης του πληθυσμού τους π.χ. οινόπνευμα κ.ά.

Η μέθοδος της αποστείρωσης (συνήθως με ακτινοβολία ή με θέρμανση στους 121°C) εφαρμόζεται σε θρεπτικά υλικά, στα σκεύη και τις επιφάνειες στις οποίες εργαζόμαστε, προκειμένου να αποτραπεί το ενδεχόμενο ανάπτυξης παθογόνων ή ανεπιθύμητων γενικότερα μικροοργανισμών σε υλικά και καθαρές καλλιέργειες. Η αποστείρωση εφαρμόζεται τόσο στο εργαστήριο και τη βιομηχανία όσο και στην Ιατρική.

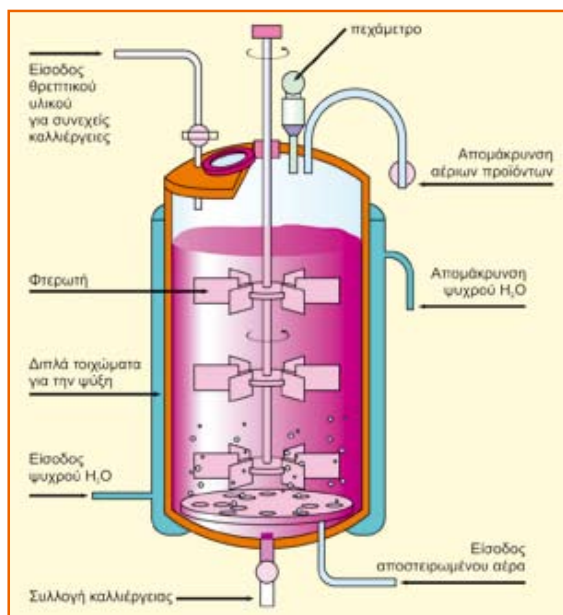
ΑΣΗΠΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ: Προληπτικά μέτρα που λαμβάνονται προκειμένου να προληφθεί οποιαδήποτε μόλυνση κατά τους χειρισμούς των μικροβιακών καλλιεργειών και των στείρων θρεπτικών υλικών στο εργαστήριο, ώστε να εξασφαλιστεί η δημιουργία καθαρής καλλιέργειας. Έτσι, π.χ. πρέπει όλα τα δοχεία καλλιέργειας να είναι εκ των προτέρων αποστειρωμένα και οι εμβολιασμοί να γίνονται κοντά στη φλόγα ενός λύχνου. Μην ξεχνάμε ότι οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού γύρω μας.

ΑΥΤΟΤΡΟΦΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ: Είναι αυτοί που χρησιμοποιούν ως ύλη μόρια με συνήθως χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο (συνεπώς δε χρησιμοποιούν διατροφικά μόρια για το ενεργειακό τους κέρδος αλλά μόνο για τα χημικά τους στοιχεία). Για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών οι οργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν μη οργανικές πηγές από το περιβάλλον όπως φως (φωτοσυνθέτοντες αυτότροφοι οργανισμοί) ή ανόργανα μόρια τα οποία οξειδώνουν κερδίζοντας την απαιτούμενη χημική ενέργεια (χημειοσυνθέτοντες αυτότροφοι μικροοργανισμοί, π.χ. νιτροποιητικά βακτήρια τα οποία μετατρέπουν το αμμωνιακό άζωτο σε νιτρικό).



ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ: Βιοαντιδραστήρας ή ζυμωτήρας ονομάζεται η ειδική συσκευή που χρησιμοποιείται για την υγρή καλλιέργεια μικροοργανισμών, συνήθως σε μεγάλη (βιομηχανική) κλίμακα. Οι συσκευές αυτές μπορούν να ελέγχουν και να ρυθμίζουν διάφορες παραμέτρους που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (θερμοκρασία, συγκέντρωση οξυγόνου, pH), εξασφαλίζοντας έτσι τις συνθήκες για συγκεκριμένες βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Εικ. 7.1: Βιοαντιδραστήρας.



ΒΙΟΜΑΖΑ: Ποσότητα οργανικής βιολογικής ύλης, που περιλαμβάνει ζωντανά και νεκρά κύτταρα μαζί με τα συστατικά τους. Η βιομάζα μαζί με τα προϊόντα της ζύμωσης (όπως εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, αντιβιοτικά, κλπ.), αποτελεί το προϊόν από την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού σε υγρή καλλιέργεια.

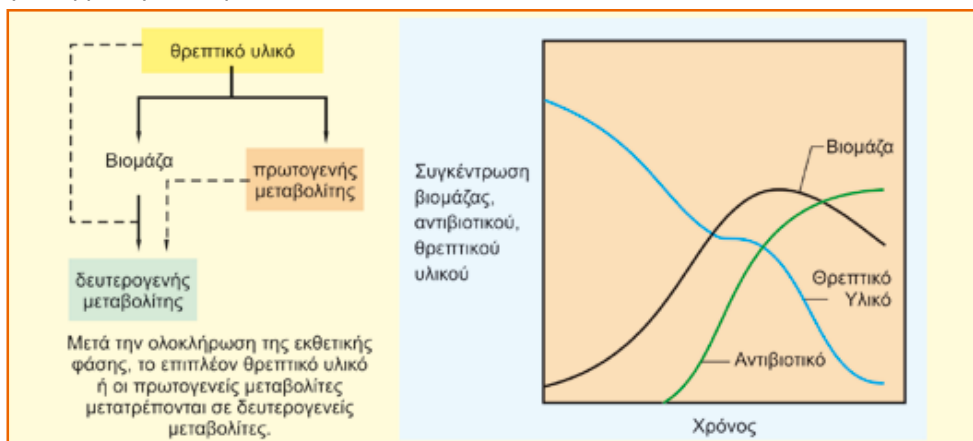


Γενικότερα ο όρος, όπως θα δούμε και στην Οικολογία (*Βιολογία Γενικής Παιδείας Γ' Λυκείου*), χρησιμοποιείται για να γίνει αναφορά στη συνολική μάζα της βιολογικής ύλης ενός οικοσυστήματος. Το οικοσύστημα μπορεί να είναι μια καλλιέργεια μικροβίων ή ακόμα και ένα τροπικό δάσος.

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ: Είναι όρος ελληνικής προέλευσης και περιλαμβάνει όλες τις δράσεις που αφορούν αξιοποίηση των ιδιοτήτων των ζωντανών οργανισμών για την παραγωγή νέων προϊόντων και τη βελτίωση υπαρχόντων. Η Βιοτεχνολογία δεν είναι νέο επιστημονικό πεδίο. Έχει ιστορία χιλιάδων ετών, αφού οι πρόγονοί μας χρησιμοποιούσαν τις ιδιότητες και τις δυνατότητες των ζωντανών οργανισμών, π.χ. των ζυμομυκήτων, για να παράγουν διάφορα προϊόντα, όπως κρασί, μπίρα, ψωμί κ.ά. Ωστόσο τα τελευταία 25 χρόνια, με την εξέλιξη των μοριακών τεχνικών και τις δυνατότητές μας να κατανοήσουμε και να τροποποιήσουμε τους βιοχημικούς μηχανισμούς των κυττάρων, έχει γίνει δυνατή η αξιοποίηση αυτής της γνώσης για διάφορες εφαρμογές. Έτσι η σύγχρονη θεώρηση της Βιοτεχνολογίας αποτελεί διεπιστημονική προσέγγιση βασικών επιστημονικών κλάδων, όπως η Γενετική, η Βιοχημεία, η Μικροβιολογία, η Κυτταρική Βιολογία, η Μοριακή Βιολογία και η Φυσιολογία. Η Βιοτεχνολογία συμβάλλει σε διάφορους τομείς, όπως είναι η Ιατρική, η γεωργία, η κτηνοτροφία, η βιομηχανία καθώς και η προστασία του περιβάλλοντος.



ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ: Είναι προϊόν του μεταβολισμού των μικροοργανισμών το οποίο δεν συμμετέχει στην ενεργειακή διαχείριση ούτε αποτελεί ζωτικό δομικό ή λειτούργητικό μόριο του οργανισμού. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες βιοσυντίθενται χρονικά κοντά στο τέλος της εκθετικής φάσης ή συνήθως στη στατική φάση. Πολλά μικροβιακά προϊόντα μεγάλου οικονομικού ενδιαφέροντος, όπως π.χ. τα αντιβιοτικά, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες.



Εικ. 7.2: Δευτερογενής Μεταβολίτης. Η παραγωγή του μεταβολίτη αρχίζει μετά ή στο τέλος της εκθετικής φάσης.

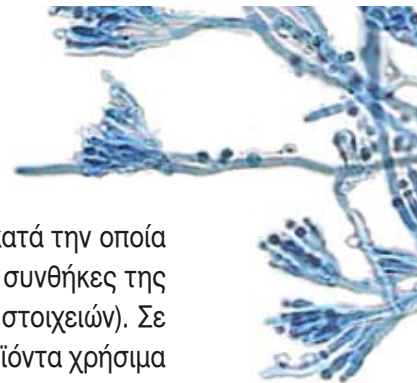


Είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε ότι κάθε διαφορετικός δευτερογενής μεταβολίτης παράγεται από ορισμένους μόνο μικροοργανισμούς. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες επίσης, δεν είναι απαραίτητοι στο μικροοργανισμό για την αύξηση και την αναπαραγωγή του αλλά ο σχηματισμός τους από τον μικροοργανισμό εξαρτάται άμεσα από τις συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας και κυρίως από τη σύσταση του θρεπτικού υλικού. Είναι δυνατή η υπερπαραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από τα κύτταρα, ανάλογα με τις συνθήκες, κάτι το οποίο δεν είναι δυνατόν να συμβεί για τους πρωτογενείς μεταβολίτες που είναι συνδεδεμένοι με την αύξηση των μικροοργανισμών. Τέλος, οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι δυνατό να σχηματίζονται από κάποια προϊόντα που συσσωρεύονται είτε στο υλικό καλλιέργειας είτε στα κύτταρα κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης.

ΔΙΗΘΗΣΗ: Είναι τεχνική διαχωρισμού των στερεών ουσιών από τα υγρά ενός υλικού. Η αρχή της τεχνικής αυτής βασίζεται στη διαφορά μεγέθους μεταξύ των πόρων του ηθμού (μεμβράνη) και των προς διήθηση ουσιών. Ουσίες μικρότερου μεγέθους από τους πόρους του ηθμού, μαζί με την υγρή φάση του υλικού περνούν τον ηθμό και διηθούνται, ενώ ουσίες μεγαλύτερου μεγέθους από τους πόρους (η στερεή φάση) κατακρατούνται στον ηθμό.

Εικ. 7.3: Η τεχνική της διήθησης.





ΕΚΘΕΤΙΚΗ ΦΑΣΗ: Φάση της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών κατά την οποία οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με το μέγιστο ρυθμό για τις δεδομένες συνθήκες της καλλιέργειας (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση οξυγόνου και θρεπτικών στοιχείων). Σε αυτή τη φάση οι μικροοργανισμοί μπορούν να παράγουν μεταβολικά προϊόντα χρήσιμα για τον άνθρωπο. (Βλέπε ένθετο, *Κινητική Ανάπτυξης των Μικροοργανισμών*)

ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ: Είναι η τεχνική της εισαγωγής του εμβολίου πάνω σε ένα στέρεο θρεπτικό υλικό ή μέσα σε ένα υγρό θρεπτικό υλικό. Το εμβολιασμένο θρεπτικό υλικό στη συνέχεια επωάζεται στις κατάλληλες συνθήκες προκειμένου να αναπτυχθεί η μικροβιακή καλλιέργεια.

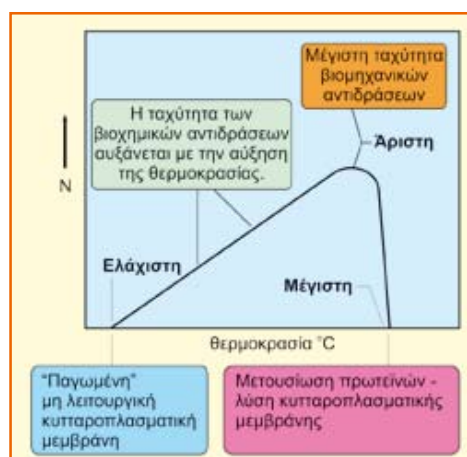


Ο όρος εμβολιασμός στην Ιατρική έχει διαφορετική έννοια: αφορά την εισαγωγή σε έναν οργανισμό μικρού αριθμού βιολογικών παραγόντων (π.χ. εξασθενημένα στελέχη ή ανενεργά συστατικά παθογόνων μικροοργανισμών), οι οποίοι αποσκοπούν στην ευαισθητοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος στο συγκεκριμένο παθογόνο μικροοργανισμό (βλέπε κεφ. 8, όρος *Εμβόλιο*).

ΕΜΒΟΛΙΟ: Ένας μικρός αριθμός ζωντανών μικροοργανισμών που προέρχεται από την ίδια καθαρή καλλιέργεια και εισάγεται με ασηπτικές τεχνικές σε ένα στείρο θρεπτικό υλικό προκειμένου να ξεκινήσει μια νέα μικροβιακή καλλιέργεια (βλέπε και κεφ. 8 αντίστοιχο όρο για την ιατρική του έννοια).

ΕΝΔΟΣΠΟΡΙΟ: Είναι μορφή που σχηματίζεται κάτω από συνθήκες περιορισμένης διατροφής (ή άλλου παράγοντα στρες) από κάποια είδη βακτηρίων. Γενικά τα ενδοσπόρια είναι πολύ περισσότερο ανθεκτικές μορφές από τα κανονικά κύτταρα των βακτηρίων στη θερμοκρασία, στους αντιμικροβιακούς παράγοντες και τις ακτινοβολίες και καταστρέφονται μόνο με αποστείρωση. Μπορούν να παραμείνουν για πολλά χρόνια (ακόμη και χιλιάδες!) σε αυτή την κατάσταση και να βλαστήσουν όταν βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ: Η θερμοκρασία είναι μία από τις πιο σημαντικές περιβαλλοντικές παραμέτρους για την αύξηση των μικροοργανισμών. Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τους ζωντανούς οργανισμούς με δύο διαφορετικούς (αντίθετους) τρόπους. Κάθε οργανισμός είναι ικανός να αναπτύσσεται μέσα σε ένα ορισμένο εύρος θερμοκρασιών. Υπάρχει η ελάχιστη θερμοκρασία κάτω από την οποία δε συμβαίνει αύξηση, η άριστη θερμοκρασία στην οποία επιτυγχάνεται ο μέγιστος ρυθμός αύξησης στο δεδομένο περι-



Εικ. 7.4: Η επίδραση της θερμοκρασίας στην μικροβιακή αύξηση.



βάλλον και η μέγιστη θερμοκρασία πάνω από την οποία δε συμβαίνει αύξηση. Η άριστη θερμοκρασία είναι πάντα πιο κοντά στη μέγιστη από ότι στην ελάχιστη.

Αυτό συμβαίνει διότι καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, αυξάνεται η ταχύτητα των βιοχημικών αντιδράσεων. Ωστόσο, πάνω από μία ορισμένη θερμοκρασία (μέγιστη) ορισμένες πρωτεΐνες μετουσιώνονται και χάνουν τη λειτουργικότητά τους. Αν και δεν είναι πλήρως κατανοητό τι συμβαίνει κάτω από την ελάχιστη θερμοκρασία και σταματάει η αύξηση, μια υπόθεση που έχει προταθεί είναι ότι χάνει την ρευστότητά της η κυτταροπλασματική μεμβράνη και επομένως και τη λειτουργικότητά της.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ pH: Η οξύτητα ή η αλκαλικότητα ενός περιβάλλοντος επηρεάζει σημαντικά τη μικροβιακή αύξηση, εφόσον η συγκέντρωση των ιόντων H^+ επηρεάζει την ενεργότητα των ενζύμων. Τα περισσότερα φυσικά περιβάλλοντα έχουν pH μεταξύ 5 και 9, έτσι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί είναι προσαρμοσμένοι να αυξάνονται σε αυτό το εύρος pH. Έχουν βρεθεί πολύ λίγα είδη μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλον με τιμές $pH > 10$.

Το ενδοκυτταρικό pH πρέπει να διατηρείται σχετικά κοντά σε ουδέτερες τιμές κάθε φορά που το εξωκυτταρικό pH είναι πολύ όξινο ή πολύ βασικό. Έτσι υπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί που διαθέτουν μηχανισμούς με τους οποίους διατηρούν το εσωτερικό τους pH σταθερό, όταν μεταβάλλεται το pH του περιβάλλοντος.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ O_2 : Το οξυγόνο ως συστατικό του H_2O και των οργανικών ενώσεων είναι ευρέως διαδεδομένο στον έμβιο κόσμο και αποτελεί μακροστοιχείο για τα κύτταρα. Το μοριακό οξυγόνο (O_2) ωστόσο, αν και θεωρείται αναγκαίο συστατικό της ατμόσφαιρας για την ύπαρξη της ζωής στον πλανήτη, στην πραγματικότητα είναι ένα δηλητηριώδες αέριο για τα κύτταρα, που δεν διαθέτουν τους κατάλληλους μηχανισμούς αδρανοποίησης των τοξικών μορφών του.

Παρόλα αυτά πολλοί οργανισμοί απαιτούν O_2 για την λειτουργία του μεταβολισμού τους, που είναι δυνατόν να γίνει μόνο αερόβια, χρησιμοποιώντας το O_2 ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων κατά την κυτταρική αναπνοή.

Βάσει των απαιτήσεων τους σε οξυγόνο οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τους αερόβιους και τους αναερόβιους. Οι αερόβιοι χρησιμοποιούν το O_2 και παράγουν πολύ περισσότερη ενέργεια από τους αναερόβιους που δεν το χρησιμοποιούν.

Η επιβλαβής δράση του O_2 στους μικροοργανισμούς οφείλεται στη μετατροπή του, εντός του κυττάρου, σε H_2O . Κατά τη μετατροπή αυτή παράγονται ενδιάμεσα παραπροϊόντα που όλα είναι τοξικά. Αυτά τα τοξικά παραπροϊόντα είναι: το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα υδροξυλίου ($OH^\cdot$). Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται παρουσία του O_2 διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα ώστε να αδρανοποιούν τις τοξικές μορφές του.

ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ: Είναι αυτοί, οι οποίοι χρησιμοποιούν διατροφικά μόρια όχι μόνο ως πηγή ενέργειας. Για το λόγο αυτό, τα διατροφικά μόρια των ετερότροφων μικροοργανισμών είναι μόρια με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο και ως εκ τούτου οργανικά μόρια (π.χ. υδατάνθρακες, πρωτεΐνες κλπ.).



Escherichia coli: Το βακτήριο αυτό, με 2 μm μήκος και 5×10^{-13} gr βάρους, αποτελεί τον οργανισμό μοντέλο της Μικροβιολογίας και της Γενετικής Μηχανικής και τον πιο καλά μελετημένο οργανισμό από οποιοδήποτε άλλο είδος. Αποτελεί μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου και άλλων ζώων. Συνήθως είναι αβλαβής (αν και ορισμένα στελέχη του μπορούν να παράγουν τοξίνες προκαλώντας διάρροια). Τα στελέχη που χρησιμοποιούνται στα πειράματα έχουν χάσει πλέον την ικανότητα ανάπτυξης στο έντερο, διότι καλλιεργούνται επί πολλά χρόνια σε τεχνητό θρεπτικό υλικό.



Εικ. 7.5: *E. coli*.

Η αλληλουχία του γενετικού υλικού του στελέχους *E. coli* MG1655 είναι πλήρως γνωστή, έχει 48-52% G-C και αποτελείται από 4.659.221 ζεύγη βάσεων. Περιέχει 4.288 γονίδια που αποτελούν το 88% του γονιδιώματος. Περίπου 1% του γονιδιώματος, το αποτελούν γονίδια που κωδικοποιούν για tRNAs και rRNAs και περίπου 0,5% του γονιδιώματος είναι μη κωδικοποιούσες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Το υπόλοιπο 10% περιλαμβάνει ρυθμιστικές αλληλουχίες, υποκινητές, χειριστές, αρχή της αντιγραφής κ.ά.

ΖΥΜΕΣ Ή ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ: Είναι οι μονοκύτταροι μύκητες, οι περισσότεροι από τους οποίους είναι ασκομύκητες. Οι ζύμες έχουν συνήθως σχήμα σφαιρικό ή κυλινδρικό αν και ορισμένες είναι δυνατόν να σχηματίσουν και ψευδομυκήλια και αναπαράγονται συνήθως μονογονικά με εκβλάστηση. Με αυτόν τον τρόπο αναπαραγωγής σχηματίζεται σε κάποιο σημείο του μητρικού κυττάρου ένα εξόγκωμα, το εκβλάστημα, το οποίο, όταν αναπτυχθεί αρκετά, είτε παραμένει ενωμένο με το μητρικό οργανισμό είτε αποκόβεται από αυτόν και ζει πλέον ως αυτοτελής οργανισμός. Τα κύτταρα των ζυμών, ως ευκαρυωτικά, είναι κατά πολύ μεγαλύτερα από αυτά των βακτηρίων και φυσικά φέρουν πυρήνα και μιτοχόνδρια.

Οι ζύμες μπορούν να μεταβολίζουν υδατάνθρακες απουσία O_2 . Στη φύση απαντούν συνήθως σε περιβάλλοντα πλούσια σε σάκχαρα, όπως φρούτα, άνθη, κ.ά. Επίσης, υπάρχουν ζύμες που ζουν συμβιωτικά με διάφορα έντομα, ενώ κάποια είδη όπως η *Candida albicans* είναι παθογόνα. Ο πιο σημαντικός ζυμομύκητας για τον άνθρωπο είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* (βλέπε αντίστοιχο όρο).

ΖΥΜΕΣ ΑΡΤΟΠΟΙΪΑΣ: Βλέπε *S. cerevisiae*.

ΖΥΜΩΣΗ: Στη βιομηχανική μικροβιολογία με τον όρο αυτό αναφερόμαστε σε οποιαδήποτε μικροβιακή διεργασία, είτε αυτή είναι βιοχημικά μία αναερόβια μεταβολική διεργασία είτε είναι μια αερόβια μεταβολική διεργασία. Βεβαίως, οι περισσότερες βιομηχανικές καλλιέργειες μικροοργανισμών είναι αερόβιες.



Στη Βιοχημεία ο όρος ζύμωση αναφέρεται στις αναερόβιες μεταβολικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα δίχως καθαρή οξειδωση. Οι διαδικασίες αυτές είναι λιγότερο αποδοτικές σε ενέργεια (ATP) για το κύτταρο.



ΘΑΝΑΤΟΥ ΦΑΣΗ: Φάση της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών, κατά την οποία ο πληθυσμός των μικροοργανισμών μειώνεται συνεχώς λόγω εξάντλησης θρεπτικών συστατικών από το υλικό καλλιέργειας (υπόστρωμα) ή/και συσσώρευσης τοξικών μεταβολιτών που εκκρίνονται από τους μικροοργανισμούς στο υπόστρωμα (βλέπε ένθετο, *Κινητική Ανάπτυξης των Μικροοργανισμών*)

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ: Είναι όλα τα χημικά στοιχεία που πρέπει να περιέχονται στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης ενός είδους μικροοργανισμού ώστε αυτός να μπορέσει να συνθέσει τα μονομερή (νουκλεοτίδια, αμινοξέα, κ.ά.) που συνιστούν τα βιολογικά μακρομόρια (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λίπη και υδατάνθρακες).

Τα διάφορα είδη μικροοργανισμών εμφανίζουν διαφορετικές ανάγκες σε θρεπτικά συστατικά και φυσικά δεν έχουν ανάγκη όλα τα θρεπτικά συστατικά στις ίδιες ποσότητες. Κάποια στοιχεία ονομάζονται μακροστοιχεία και είναι απαραίτητα σε μεγάλες ποσότητες και κάποια άλλα ονομάζονται μικροστοιχεία ή ιχνοστοιχεία, διότι απαιτούνται σε μικρές ή σε πολύ μικρές ποσότητες. Τα ιχνοστοιχεία αν και χρειάζονται σε πολύ μικρές ποσότητες, η παντελής έλλειψή τους έχει δυσμενείς επιπτώσεις στη ζωή του κυττάρου.

Τα μακροστοιχεία είναι κυρίως ο άνθρακας (C) και το άζωτο (N) αλλά και ο φώσφορος (P), το θείο (S), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), το νάτριο (Na) κ.ά.

Μερικά ιχνοστοιχεία είναι το μαγγάνιο (Mn), το σελήνιο (Se), το μολυβδένιο (Mo) κ.ά.

Όλα τα στοιχεία πρέπει να παρέχονται στους μικροοργανισμούς σε εύληπτη μορφή.

Στοιχείο	Βιολογικός Όρος
Οξυγόνο (O)	Συστατικό του H_2O και όλων των μακρομορίων, απαραίτητο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση.
Άνθρακας (C)	Συνιστά το σκελετό όλων των οργανικών ενώσεων.
Υδρογόνο (H)	Συστατικό του H_2O και όλων των μακρομορίων.
Άζωτο (N)	Συστατικό των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών.
Φώσφορος (P)	Συστατικό των νουκλεϊκών οξέων και του ATP (του ενεργειακού “νομίσματος” των κυττάρων).
Θείο (S)	Συστατικό των πρωτεϊνών.
Μαγνήσιο (Mg)	Συστατικό πολλών ενζύμων (π.χ. DNA πολυμεράση).
Μαγγάνιο (Mn)	Ενεργοποιητής πολλών ενζύμων.
Σελήνιο (Se)	Σχηματισμός πολλών ενζύμων (π.χ. αφυδρογονασών).
Μολυβδένιο (Mo)	Συστατικό πολλών ενζύμων κυρίως φλαβινο-πρωτεϊνών.

Πίνακας 7.1: Τα θρεπτικά στοιχεία και ο βιολογικός τους ρόλος.

ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ: Είναι κάθε υγρό ή στερεό υλικό που περιέχει θρεπτικά συστατικά και μπορεί να καλύψει τις θρεπτικές ανάγκες ενός μικροβιακού πληθυσμού. Περιέχει



νερό, πηγή άνθρακα και αζώτου καθώς και κάθε άλλο χημικό παράγοντα απαραίτητο για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Συνήθως μέσω του θρεπτικού υποστρώματος παρέχεται και η κατάλληλη ενεργειακή πηγή, η οποία σε πολλές περιπτώσεις είναι ταυτόχρονα και η πηγή άνθρακα ή/και αζώτου. Ο όρος είναι συνώνυμος με το θρεπτικό υλικό ή με το θρεπτικό μέσο.

ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (ΑΞΕΝΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ): Είναι η μικροβιακή καλλιέργεια (υγρή ή στερεή) στην οποία αναπτύσσονται μικροοργανισμοί ενός μόνο είδους ή ενός μόνο στελέχους.

Για να μπορέσουμε να δημιουργήσουμε μια καθαρή καλλιέργεια ενός μικροοργανισμού πρέπει να μπορούμε να τον απομονώσουμε από το φυσικό του περιβάλλον και να μπορούμε να τον αναπτύξουμε στο εργαστήριο. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να μπορούμε να τον προμηθεύσουμε με τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά στις κατάλληλες δοσολογίες και να δημιουργήσουμε και να διατηρήσουμε τις κατάλληλες για την ανάπτυξη του περιβαλλοντικές συνθήκες. Είναι επίσης ουσιαστικό, όλοι οι χειρισμοί να γίνουν υπό ασηπτικές συνθήκες ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση της καλλιέργειας από άλλους μικροοργανισμούς.

Οι καθαρές καλλιέργειες είναι απαραίτητες για να μπορέσουμε να μελετήσουμε έναν μικροοργανισμό.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: Είναι η διεργασία της ανάπτυξης μικροοργανισμών, φυτικών ή ζωικών κυττάρων ή και ιστών, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (θρεπτικά συστατικά, pH, θερμοκρασία, αερισμός κλπ.).

ΚΛΕΙΣΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: Είναι μία υγρή μικροβιακή καλλιέργεια στην οποία ένας ορισμένος όγκος στείρου θρεπτικού υλικού εμβολιάζεται με ορισμένου είδους ή στελέχους μικροβιακά κύτταρα, τα οποία είναι ικανά να αναπτυχθούν σε αυτό το θρεπτικό υλικό. Το εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο επωάζεται σε κατάλληλες συνθήκες για ορισμένο χρόνο. Τα μικροβιακά κύτταρα μίας κλειστής καλλιέργειας βρίσκονται συνεχώς σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον εξαιτίας της βαθμιαίας κατανάλωσης των θρεπτικών συστατικών και της βαθμιαίας συσσώρευσης των εξωκυτταρικών προϊόντων (μεταβολιτών) των κυττάρων της καλλιέργειας. Έτσι, οι μικροοργανισμοί της καλλιέργειας ακολουθούν διαδοχικά τη λανθάνουσα, την εκθετική, τη στατική και τέλος τη φάση θανάτου (βλέπε ένθετο, *Κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών*).

Clostridium: Πρόκειται για ένα γένος υποχρεωτικά αναερόβιων βακτηρίων πολλά από τα οποία είναι παθογόνα για τον άνθρωπο καθώς παράγουν ισχυρές τοξίνες, όπως για παράδειγμα το είδος *Clostridium tetani*, που προκαλεί την ασθένεια του τετάνου.

ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ ΦΑΣΗ: Φάση της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών, κατά την οποία οι μικροοργανισμοί που προέρχονται από τον αρχικό εμβολιασμό, προσαρμόζονται στο νέο περιβάλλον, ενεργοποιώντας τα κατάλληλα γονίδια για την ανάπτυξή τους. Στη φάση αυτή, ο ρυθμός αύξησης του μικροοργανισμού είναι πολύ χαμηλός, σχεδόν μηδενικός, με αποτέλεσμα ο μικροβιακός πληθυσμός να θεωρείται σταθερός (βλέπε ένθετο, *Κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών*).



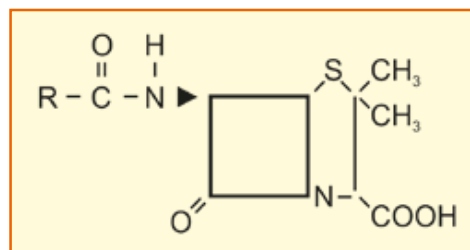
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: Η διεργασία της ανάπτυξης ενός ορισμένου είδους ή στελέχους μικροοργανισμών κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Οι μικροβιακές καλλιέργειες συνήθως ξεκινάνε με τον εμβολιασμό ενός θρεπτικού υλικού (υγρού ή στερεού) με μικρό αριθμό ζωντανών κυττάρων ή σπορίων από μία άλλη καλλιέργεια ή με κάποια υλικά π.χ. έδαφος, στα οποία αναμένεται να υπάρχουν κάποιοι ζωντανοί μικροοργανισμοί. Κάθε μικροοργανισμός για να είναι δυνατή η καλλιέργειά του, χρειάζεται διαφορετικό θρεπτικό υλικό και διαφορετικές συνθήκες επώασης.



Ο ίδιος όρος χρησιμοποιείται και ως αντικείμενο, δηλαδή αναφέρεται στο υγρό ή στερεό θρεπτικό υλικό μέσα ή πάνω στο οποίο έχει αναπτυχθεί ένα συγκεκριμένο είδος ή στέλεχος μικροοργανισμών, μετά τον εμβολιασμό του με ένα μικρό αριθμό κυττάρων αυτού του είδους ή του στελέχους.

Mycobacterium: Είναι ένα γένος υποχρεωτικά αερόβιων βακτηρίων, πολλά από τα οποία είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, προκαλώντας λοιμώδη νοσήματα όπως η λέπρα (*M. leprae*) και η φυματίωση (*M. tuberculosis*).

ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΗ: Είναι το πρώτο αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε. Η ανακάλυψη της πενικιλλίνης έγινε “τυχαία” από το μικροβιολόγο Αλεξάντερ Φλέμινγκ το 1928, όταν παρατήρησε ότι η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων που καλλιεργούσε στο εργαστήριο του, είχε ανασταλεί όταν σε αυτές είχε αναπτυχθεί ο μύκητας *Penicillium notatum*.



Εικ. 7.6: Χημική δομή της πενικιλλίνης.

Οι πενικιλλίνες αποτελούν μία ομάδα αντιβιοτικών που παράγεται από πολυκύτταρους μύκητες των γενών *Penicillium* και *Aspergillus* καθώς και από ορισμένα βακτήρια. Οι πενικιλλίνες δρουν κυρίως εναντίον βακτηρίων.

Η βιολογική δράση της πενικιλλίνης οφείλεται στην ύπαρξη του β-λακταμικού δακτυλίου, ο οποίος αντιδρά με ένα ένζυμο των βακτηρίων και το απενεργοποιεί. Αυτό το ένζυμο, είναι απαραίτητο για τη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων του βακτηρίου. Τα βακτήρια που φέρουν ατελή κυτταρικά τοιχώματα διαρρηγνύονται εύκολα και θανατώνονται.



Οι επιστημονικές ανακαλύψεις είναι κατά κανόνα προϊόν σκληρής δουλειάς και ορθολογικών συλλογισμών. Ωστόσο πολλές φορές παίζει και η τύχη τον ρόλο της. Η ανακάλυψη της πενικιλλίνης από τον Σκωτσέζο βακτηριολόγο Alexander Fleming το 1928 είναι ίσως το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα καλοτυχίας στην ιστορία της επιστήμης! Βεβαίως μην ξεχνάμε ότι “η τύχη ευνοεί τον προετοιμασμένο νου”! Η ανακάλυψη του πρώτου αντιβιοτικού έγινε επειδή έλαβαν χώρα μία αλληλουχία τυχαίων γεγονότων.



Το καλοκαίρι του 1928, ο Α. Fleming έφυγε για διακοπές αφήνοντας στο εργαστήριο μία στέρεη καλλιέργεια *Staphylococcus aureus*. Αρχικά, ένα κύμα ψύχους 9 ημερών εμπόδισε το βακτήριο να αναπτυχθεί. Στο ίδιο διάστημα ο αέρας μετέφερε στο τρυβλίο σπόρια του μύκητα *Penicillium notatum*, που αναπτυσσόταν στο πάτωμα. Κατόπιν αυξήθηκε η θερμοκρασία και οι δύο μικροοργανισμοί άρχισαν να αναπτύσσονται στο τρυβλίο. Όταν ο Α. Fleming επέστρεψε στο εργαστήριο θέλησε να αποστειρώσει το τρυβλίο, παρατήρησε όμως ότι η ανάπτυξη του *Penicillium* κατέστρεψε τις αποικίες του *Staphylococcus*. Η παρατήρηση αυτή άλλαξε την ροή της ανθρωπότητας!

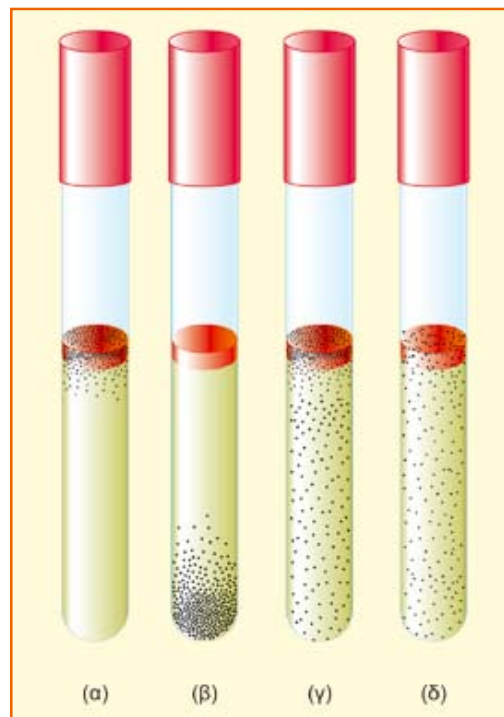
Ο Α. Fleming, συνειδητοποίησε ότι ο μύκητας παρήγαγε κάποια χημική ουσία που θανάτωσε τα βακτήρια, ωστόσο ο ίδιος δεν κατόρθωσε να την απομονώσει. Η απομόνωση του πρώτου αντιβιοτικού, που ονομάστηκε πενικιλίνη μιας και παράγεται από τους μύκητες του γένους *Penicillium*, έγινε το 1939 από τους Howard Florey και Ernest Chain.

Η πενικιλίνη αρχικά δοκιμάστηκε σε ποντίκια και από το 1943 άρχισε να παράγεται σε μεγάλες ποσότητες για στρατιωτική χρήση ενώ το 1944, χρησιμοποιήθηκε και στους αμάχους.

Οι Α. Fleming, Η. Florey και Ε. Chain, μοιράστηκαν το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας ή Ιατρικής για την ανακάλυψη και την απομόνωση της πενικιλίνης.

ΠΡΟΑΙΡΕΤΙΚΑ ΑΕΡΟΒΙΟΙ (Ή ΠΡΟΑΙΡΕΤΙΚΑ ΑΝΑΕΡΟΒΙΟΙ)*: Είναι οι μικροοργανισμοί που θα χρησιμοποιήσουν το μοριακό οξυγόνο για το μεταβολισμό τους όταν αυτό υπάρχει, αλλά διαθέτουν και τα κατάλληλα μεταβολικά μονοπάτια ώστε να μεταβολίσουν τα σάκχαρα και να αναπτυχθούν και απουσία O_2 . Οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται με ταχύτερο ρυθμό παρουσία O_2 από ότι απουσία του. Αυτό συμβαίνει διότι παρουσία O_2 μεταβολίζουν τα διατροφικά μόρια μέσω μεταβολικών οδών που αποδίδουν πολύ μεγαλύτερα ποσά ενέργειας στο κύτταρο.

Εικ. 7.7: Η επίδραση του O_2 στην αύξηση των μικροοργανισμών.
(α) υποχρεωτικά αερόβιος, (β) υποχρεωτικά αναερόβιος, (γ) προαιρετικά αερόβιος, (δ) αεροανθεκτικός αναερόβιος.



* Στη διεθνή βιβλιογραφία απαντώνται και οι δύο όροι για την ίδια κατηγορία μικροοργανισμών. Πάντως πιο συχνά απαντώμενος όρος είναι ο όρος "προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί" (βλέπε μπλε πλαίσιο).



Επειδή λοιπόν, αναερόβια παράγεται από το κύτταρο μικρότερο ποσό ενέργειας από ότι αερόβια, προκειμένου να παράγει το κύτταρο αρκετή ενέργεια, θα καταναλώσει τα σάκχαρα με ταχύτερο ρυθμό αναερόβια από ότι αερόβια.

Παραδείγματα προαιρετικά αερόβιων μικροοργανισμών είναι το βακτήριο *E. coli* και ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae*.

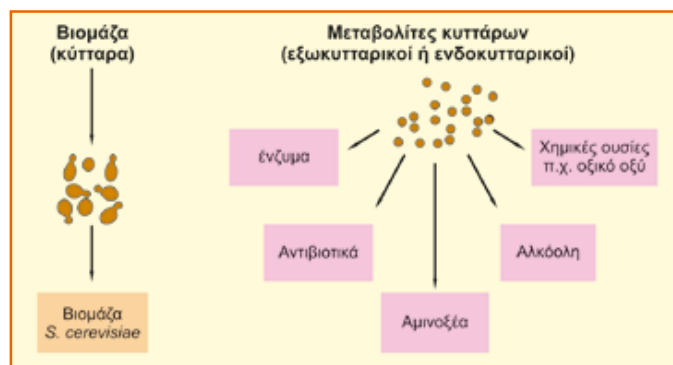
Από πλευράς μεταβολισμού μία ιδιαίτερη κατηγορία μικροοργανισμών είναι οι **αερο-ανθεκτικοί αναερόβιοι μικροοργανισμοί**. Οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το O_2 για την ανάπτυξή τους, αλλά είναι ικανοί να αναπτύσσονται παρουσία του. Παράδειγμα τέτοιων μικροοργανισμών είναι τα βακτήρια *Lactobacillus* sp., τα οποία διαθέτουν αναερόβιο καταβολισμό των σακχάρων (ζύμωση) αλλά ταυτόχρονα το O_2 δεν τα θανατώνει.



Ο όρος **προαιρετικά**, αναφέρεται στην ικανότητα ενός μικροοργανισμού να προσαρμόζεται σε έναν εναλλακτικό τρόπο διαβίωσης, διαφορετικό από το φυσιολογικό, όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος το επιβάλλουν. Σε μοριακό επίπεδο, η ικανότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τέτοιοι μικροοργανισμοί διαθέτουν τα κατάλληλα γονίδια και τους κατάλληλους μηχανισμούς ρύθμισής τους, ώστε να μπορούν να προσαρμόζουν την φυσιολογία τους (το μεταβολισμό τους) σε διαφορετικές συνθήκες. Έτσι, ένας αερόβιος μικροοργανισμός μπορεί να είναι προαιρετικά αναερόβιος. Δηλαδή, ο όρος “προαιρετικά” συνήθως ακολουθείται από την εναλλακτική - διάφορη της φυσιολογικής - προσαρμογής που εφαρμόζει ο μικροοργανισμός.

ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΖΥΜΩΣΗΣ: Είναι τα χρήσιμα για τον άνθρωπο προϊόντα της καλλιέργειας των μικροοργανισμών σε βιομηχανική κλίμακα. Τα προϊόντα αυτά μπορεί να είναι οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί (βιομάζα) ή να παράγονται από τους μικροοργανισμούς ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού τους είτε κατά την εκθετική φάση (πρωτογενείς μεταβολίτες) είτε κατά τη στατική φάση (δευτερογενείς μεταβολίτες).

Ένας μεταβολίτης που παράγεται από ένα μικροοργανισμό μπορεί να είναι τοξικός για αυτόν αλλά χρήσιμος για τον άνθρωπο.



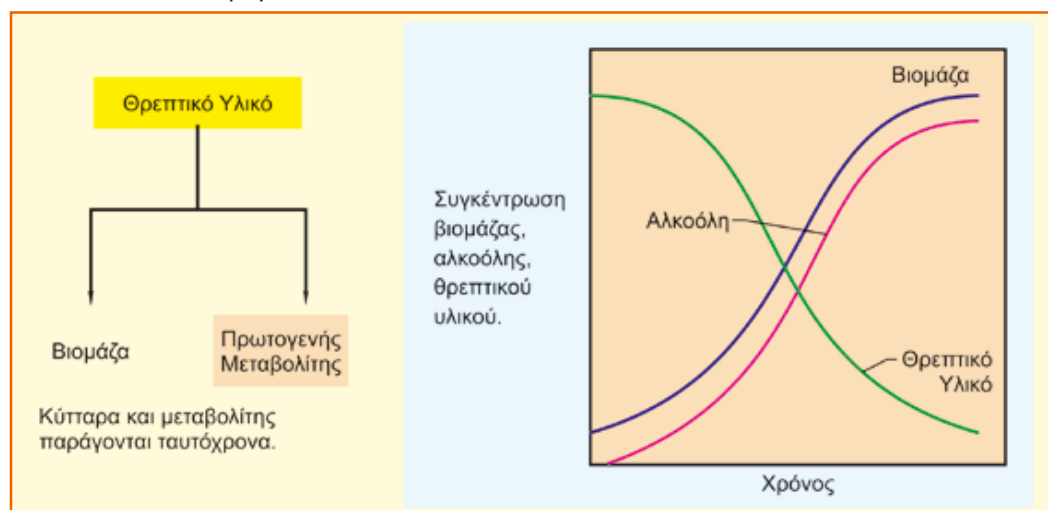
Εικ. 7.8: Προϊόντα της καλλιέργειας μικροοργανισμών.



Ένας βιομηχανικού ενδιαφέροντος μικροοργανισμός που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή κάποιου προϊόντος χρήσιμου για τον άνθρωπο, πρέπει να διαθέτει κάποια χαρακτηριστικά και αυτά είναι:

- α) Να μπορεί να παράγει το επιθυμητό προϊόν με μεγάλη απόδοση.
- β) Να αναπτύσσεται γρήγορα σε φθηνά θρεπτικά υλικά που είναι διαθέσιμα σε μεγάλες ποσότητες (π.χ. μελάσα).
- γ) Να είναι επιδεκτικός σε γενετική τροποποίηση με μεθόδους Γενετικής Μηχανικής.
- δ) Κατά προτίμηση να μην είναι παθογόνος.
- ε) Τα παραπροϊόντα της καλλιέργειας να μην επιβαρύνουν το περιβάλλον.

ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ: Είναι προϊόν του μεταβολισμού των μικροοργανισμών που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης. Μια τυπική μικροβιακή διεργασία στην οποία το προϊόν σχηματίζεται κατά την εκθετική φάση είναι η αλκοολική ζύμωση, κατά την οποία παράγεται αλκοόλη από τα κύτταρα της ζύμης *S. cerevisiae* όταν αναπτύσσεται αναερόβια.



Εικ. 7.9: Πρωτογενής Μεταβολίτης. Η καμπύλη που περιγράφει την παραγωγή του μεταβολίτη (αλκοόλη) είναι παράλληλη της καμπύλης αύξησης του πληθυσμού της καλλιέργειας.

ΡΥΘΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ: Εκφράζει την ταχύτητα με την οποία αυξάνεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών σε μία καλλιέργεια. Είναι μέγεθος αντιστρόφως ανάλογο του χρόνου διπλασιασμού της καλλιέργειας καθώς όσο μικρότερος είναι ο χρόνος διπλασιασμού μιας καλλιέργειας τόσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός ανάπτυξής τους. Ο ρυθμός ανάπτυξης μιας καλλιέργειας εξαρτάται, όπως και ο χρόνος διπλασιασμού της καλλιέργειας, από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων, το pH, τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση O_2 στο μέσο καλλιέργειας.



ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ: Φάση της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε κλειστή καλλιέργεια, κατά την οποία ο μικροβιακός πληθυσμός είναι ο μέγιστος δυνατός. Στη φάση αυτή τα μικροβιακά κύτταρα δε διαιρούνται περαιτέρω. Ο ρυθμός αύξησης είναι συνεπώς μηδενικός. Κύρια αιτία της εμφάνισης της στατικής φάσης είναι εξάντληση των θρεπτικών συστατικών ή/και η συσσώρευση τοξικών υποπροϊόντων του κυτταρικού μεταβολισμού ή τέλος, η εξάντληση του διαθέσιμου χώρου για την αύξησή του. Συνήθως είναι η φάση κατά την οποία τα μικροβιακά κύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες μεταβολικών προϊόντων χρήσιμων για τον άνθρωπο.

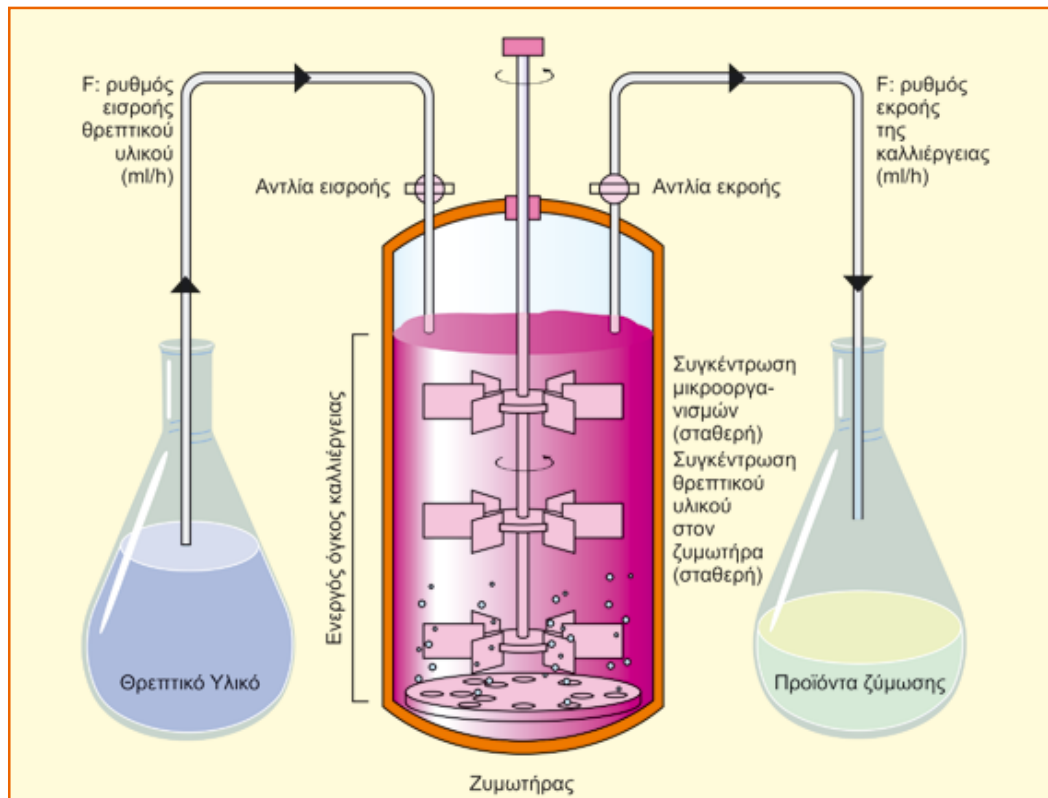
Τα προϊόντα αυτά, παράγονται από τα μικροβιακά κύτταρα, πιθανόν ως συνέπεια της προσπάθειάς τους να διατηρηθούν στη ζωή, σε ένα περιβάλλον με οριακούς ενεργειακούς και θρεπτικούς πόρους ή/και σε ένα περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση κάποιου τοξικού παράγοντα. Συνεπώς τα μεταβολικά προϊόντα τα οποία παράγονται είναι αποτέλεσμα ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων του μικροοργανισμού ώστε να γίνει ανταγωνιστικός στο αφιλόξενο, πλέον, περιβάλλον. Από τα παραπάνω μπορούμε να κατανοήσουμε την παραγωγή από τα μικροβιακά κύτταρα αμυντικών ουσιών (τις οποίες ο άνθρωπος χρησιμοποιεί ως αντιβιοτικά) κατά τη στατική φάση. *(Βλέπε ένθετο, Κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών)*

ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: Είναι η ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό. Η δημιουργία στερεού θρεπτικού υλικού γίνεται με την προσθήκη στο υγρό μέσο μικρής ποσότητας άγαρ ($\approx 20\text{g/l}$). Το στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό περιέχεται συνήθως σε κατάλληλα γυάλινα ή συνθετέτερα πλαστικά δισκία που ονομάζονται τρυβλία Petri. Πάνω στο στερεό θρεπτικό υλικό τα μικροβιακά κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν αποικίες.



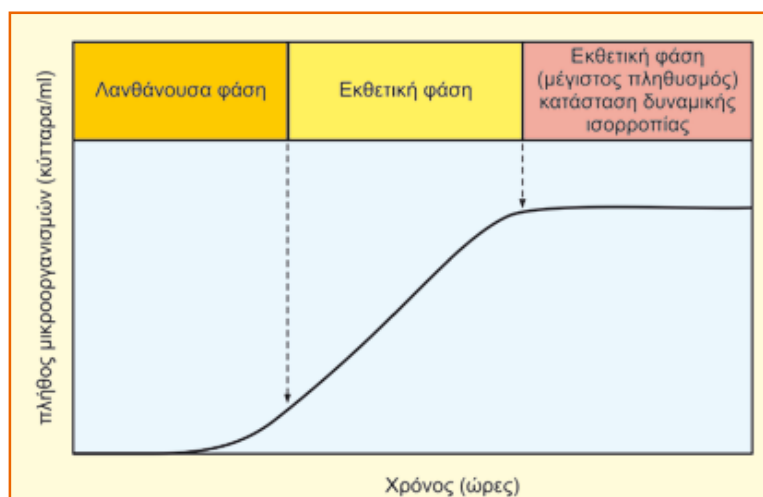
Εικ. 7.10: Ζυμομύκητας αναπτυγμένος σε στέρεο θρεπτικό υλικό.

ΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: Είναι ο τύπος καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα, κατά τον οποίο οι μικροοργανισμοί της καλλιέργειας τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικά συστατικά, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται από την καλλιέργεια κύτταρα, προϊόντα του μεταβολισμού τους (ορισμένα από τα οποία μπορεί να είναι και τοξικά για τα κύτταρα), καθώς και το θρεπτικό υλικό που δεν έχει καταναλωθεί. Με αυτόν τον τρόπο οι μικροοργανισμοί, μετά από ένα σύντομο διάστημα προσαρμογής που ακολουθεί του εμβολιασμού, βρίσκονται διαρκώς σε εκθετική φάση ανάπτυξης αφού δε διαμορφώνονται ποτέ συνθήκες, οι οποίες θα οδηγούσαν την καλλιέργεια σε στατική και ακολούθως σε φάση θανάτου *(βλέπε ένθετο, Κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών)*.



Εικ. 7.11.α: Βιοαντιδραστήρας στον οποίο πραγματοποιείται συνεχής καλλιέργεια.

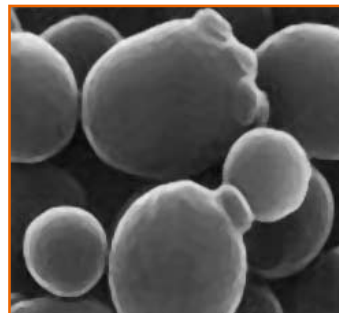
Το στείρο υλικό εισάγεται στον αντιδραστήρα με τη βοήθεια αντλίας με ρυθμό F . Στον αντιδραστήρα πραγματοποιείται επαρκής ανάδευση, αερισμός και ρύθμιση του pH. Ο ενεργός όγκος της καλλιέργειας διατηρείται σταθερός. Στην κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, η συγκέντρωση των κυττάρων, ο ρυθμός αύξησης και συνολικά το χημικό περιβάλλον μέσα στο βιοαντιδραστήρα (συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών και μεταβολικών προϊόντων) παραμένουν σταθερά με το χρόνο. Η συγκέντρωση του πληθυσμού (x mg/ml) ελέγχεται από τη συγκέντρωση του περιοριστικού για την αύξηση παράγοντα (οριακή συγκέντρωση κάποιου θρεπτικού συστατικού ή κάποιου τοξικού μεταβολίτη).



Εικ. 7.11.β: Καμπύλη ανάπτυξης συνεχούς καλλιέργειας.



Saccharomyces cerevisiae: Πρόκειται για ζυμομύκητα με 16 χρωμοσώματα, ο οποίος συνήθως πολλαπλασιάζεται με εκβλάστηση. Συγκεκριμένα αποτελεί την πιο σημαντική εμπορική ζύμη για τη βιομηχανία της αρτοποιίας και της ποτοποιίας. Ο ζυμομύκητας αυτός μπορεί να αυξηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα σακχάρων, παρουσία O_2 περισσότερο αποτελεσματικά παράγοντας βιομάζα και CO_2 από ότι απουσία O_2 , όπου επιτελεί αλκοολική ζύμωση, παράγοντας CO_2 και αλκοόλη. Η αρτοποιομηχανία αξιοποιεί το CO_2 για το “φούσκωμα” του ψωμιού, ενώ η ποτοποιία ενδιαφέρεται φυσικά για την αλκοόλη.



Εικ. 7.12: *Saccharomyces cerevisiae*.

Στο φυσικό περιβάλλον, ο *Saccharomyces cerevisiae* απαντάει συνήθως στα φρούτα και τους χυμούς τους, όμως τα εμπορικά στελέχη που χρησιμοποιούνται σήμερα στη βιομηχανία διαφέρουν από τα άγρια στελέχη της ζύμης καθώς επί σειρά ετών γίνεται επιλογή βελτιωμένων στελεχών στο εργαστήριο.

Η σχέση του ανθρώπου με τον *Saccharomyces cerevisiae* χρονολογείται τουλάχιστον από την εποχή που ο άνθρωπος έμαθε να παρασκευάζει ψωμί, οίνο και μπίρα. Όμως η επιστημονική μελέτη της ζύμης άρχισε με τον Λουί Παστέρ στα τέλη του προηγούμενου αιώνα και συνεχίζεται μέχρι σήμερα, καθώς αποτελεί έναν εξαιρετικό ευκαρυωτικό οργανισμό μοντέλο για τη μελέτη των ευκαρυωτικών κυττάρων. Μάλιστα, ο *Saccharomyces cerevisiae* ήταν ο πρώτος ευκαρυωτικός οργανισμός, στον οποίο πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του γονιδιώματός του.

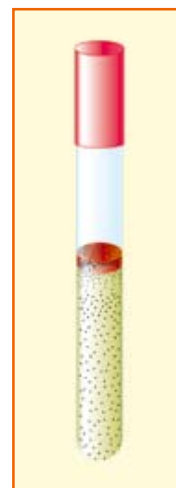
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ: Η ανάκτηση και ο καθαρισμός του προϊόντος που μας ενδιαφέρει από μία ζύμωση είναι ένα πολύ βασικό βήμα. Η δυσκολία του εξαρτάται κυρίως από τη φύση του προϊόντος. Το προϊόν μπορεί να είναι βιομάζα, ένας εξωκυτταρικός ή ένας ενδοκυτταρικός μεταβολιτής. Καθώς η χημική σύσταση της μικροβιακής καλλιέργειας είναι σύνθετη και για ορισμένα προϊόντα (π.χ. φαρμακευτικά προϊόντα) απαιτείται εξαιρετική καθαρότητα ή/και είναι πολύ ευαίσθητα (π.χ. στη θέρμανση), η ανάκτηση και ο καθαρισμός αποτελούνται συχνά από πολλά βήματα και σε πολλές περιπτώσεις το κόστος τους είναι υψηλότερο από αυτό της παραγωγής του προϊόντος.

Η στρατηγική που ακολουθείται μπορεί να συνοψιστεί σε τέσσερα βασικά βήματα:

- α)** Διαχωρισμό αδιάλυτων προϊόντων και άλλων στερεών.
- β)** Αρχική απομόνωση ή συμπύκνωση του προϊόντος.
- γ)** Καθαρισμός ή απομάκρυνση των περιεχόμενων χημικών.
- δ)** Προετοιμασία του προϊόντος.

Για την ανάκτηση ενός ενδοκυτταρικού μεταβολιτή, πρέπει να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων και στη συνέχεια απομάκρυνση των υπόλοιπων κυτταρικών προϊόντων.

ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: Είναι η ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού σε κατάλληλο υγρό θρεπτικό υλικό. Μετά τον εμβολιασμό του στείρου θρεπτικού



Εικ. 7.13: Υγρή καλλιέργεια.

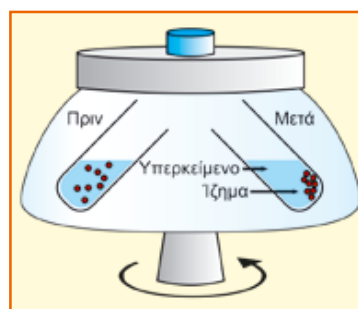


υλικού η καλλιέργεια επωάζεται σε κατάλληλο περιβάλλον, οπότε τα κύτταρα αναπτύσσονται στο υγρό μέσο δημιουργώντας ένα εναιώρημα κυττάρων. Τα νεκρά κύτταρα καθιζάνουν στον πυθμένα του δοχείου καλλιέργειας.

ΥΠΟΧΡΕΩΤΙΚΑ ΑΕΡΟΒΙΟΙ: Είναι αυτοί που για την ανάπτυξή τους απαιτούν υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, π.χ. τα βακτήρια του γένους *Mycobacterium*. Σε αντίθεση με τους προαιρετικά αερόβιους, οι υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί δεν αναπτύσσονται καθόλου σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Αυτοί οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν το O_2 κατά το μεταβολισμό τους για την παραγωγή ενέργειας και δεν διαθέτουν εναλλακτικά αναερόβια μεταβολικά μονοπάτια.

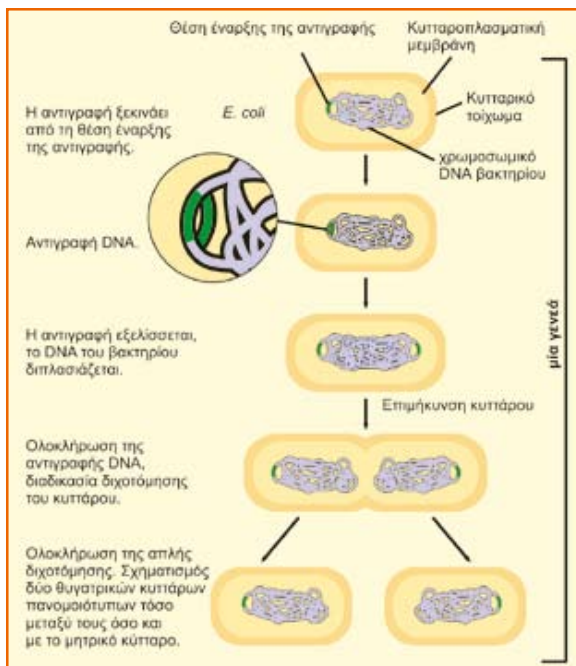
ΥΠΟΧΡΕΩΤΙΚΑ ΑΝΑΕΡΟΒΙΟΙ: Είναι οι μικροοργανισμοί που δεν αναπτύσσονται καθόλου όταν υπάρχει οξυγόνο επειδή είναι τοξικό γι' αυτούς, π.χ. τα βακτήρια του γένους *Clostridium*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαθέτουν κατάλληλα μεταβολικά μονοπάτια, στα οποία δεν υπάρχουν βιοχημικές αντιδράσεις που να απαιτούν O_2 . Ακόμη οι μικροοργανισμοί αυτοί δε διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα αδρανοποίησης των τοξικών μορφών του οξυγόνου, με αποτέλεσμα να πεθαίνουν παρουσία του.

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ: Είναι τεχνική διαχωρισμού στέρεων και υγρών ενός υλικού. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό σωματιδίων μεγέθους από 100 μέχρι 0,1 μm από υγρό με τη βοήθεια της φυγοκέντρου δύναμης. Το υλικό που θα υποβληθεί σε φυγοκέντρωση μοιράζεται ισοβαρώς σε δοχεία, τα οποία τοποθετούνται σε κατάλληλους υποδοχείς στην κεφαλή της συσκευής φυγοκέντρωσης. Η κεφαλή περιστρέφεται με μεγάλη ταχύτητα (π.χ. 15.000 στροφές/λεπτό) γύρω από τον κατακόρυφο άξονα συμμετρίας της κεφαλής για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Κατά τη φυγοκέντρωση, τα στερεά συστατικά καθιζάνουν σε διαφορετικούς χρόνους, ανάλογα με το μέγεθος και το ειδικό τους βάρος. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης έχουν διαχωριστεί τα συστατικά του αρχικού υλικού ανάλογα με τη φύση τους και τις συνθήκες φυγοκέντρωσης.

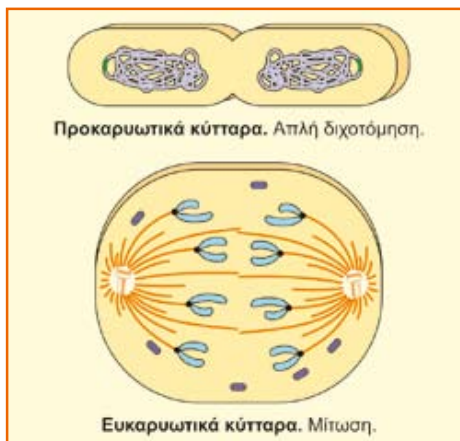


Εικ. 7.14: Φυγοκέντρωση.

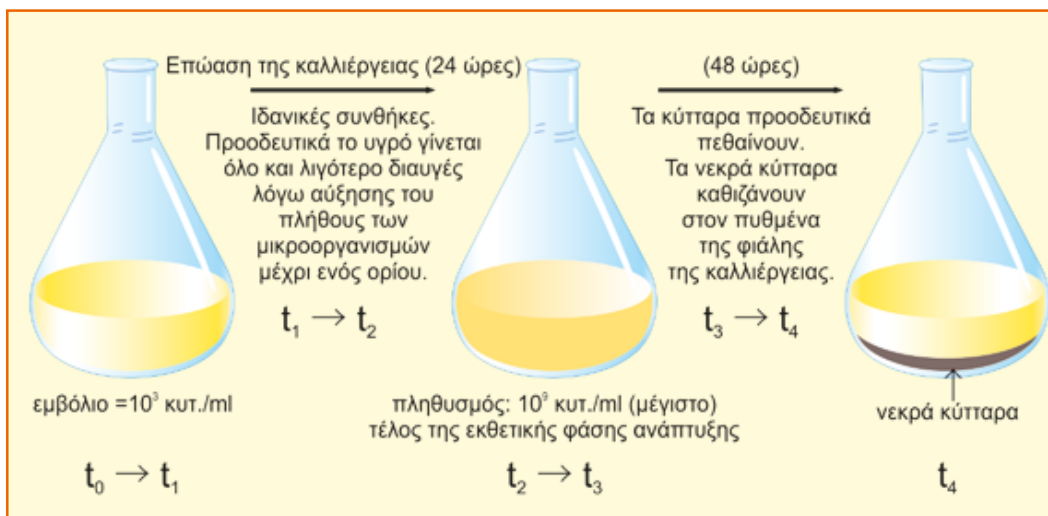
ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ: Είναι ο χρόνος ο οποίος απαιτείται ώστε να διαιρεθούν τα κύτταρα ενός πληθυσμού μικροοργανισμών. Με άλλα λόγια είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί για την παραγωγή δύο κυττάρων από ένα, για κάθε άτομο του πληθυσμού. Συνεπώς στο τέλος του χρόνου διπλασιασμού ο μικροβιακός πληθυσμός θα έχει διπλασιαστεί. Ο χρόνος αυτό είναι σταθερός κάτω από σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος και χαρακτηριστικός για κάθε είδος μικροοργανισμού. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού και κατά συνέπεια το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, ο αερισμός, η θερμοκρασία και το pH.



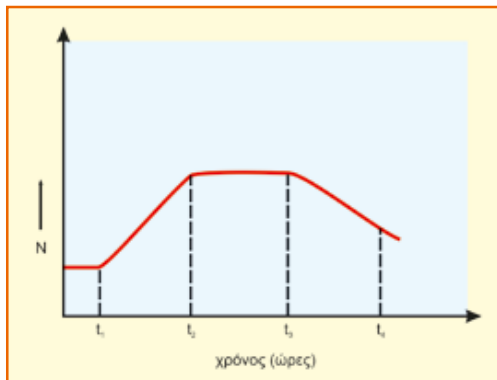
Εικ. 7.15.α: Απλή διχοτόμηση (μονογονική αναπαραγωγή) τρόπος πολλαπλασιασμού των προκαρυωτικών οργανισμών.



Εικ. 7.15.β: Σύγκριση διπλασιασμού προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων. Απλή διχοτόμηση - Μίτωση.



Εικ. 7.15.γ: Ανάπτυξη μικροβιακής καλλιέργειας (μακροσκοπική παρατήρηση).



Εικ. 7.15.δ: Καμπύλη ανάπτυξης της μικροβιακής καλλιέργειας.



ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πιο σημαντική αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών με το φυσικοχημικό τους περιβάλλον είναι η ανάπτυξή τους. Η ανάπτυξη είναι το αποτέλεσμα τόσο της αναπαραγωγής όσο και της μεταβολής του μεγέθους των κυττάρων. Ωστόσο συνήθως όταν συζητάμε για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε μία καλλιέργειά τους, δεν αναφερόμαστε στην αύξηση του μεγέθους των μικροβιακών κυττάρων, αλλά στην αύξηση του αριθμού των μικροοργανισμών μέσα στην καλλιέργεια αυτή.

Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ποικίλες φυσικές, χημικές και διατροφικές συνθήκες. Μέσα ή πάνω στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό, οι μικροοργανισμοί προσλαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και τα μετατρέπουν μέσω του μεταβολισμού τους σε βιολογικές ενώσεις. Ένα μέρος των θρεπτικών συστατικών τα χρησιμοποιούν για την παραγωγή ενέργειας, ενώ κάποιο άλλο μέρος χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση διαφόρων προϊόντων (μεταβολιτών).

Ως συνέπεια της μετατροπής του θρεπτικού μέσου προκύπτει η αύξηση των μικροοργανισμών με το χρόνο. Δηλαδή:

Θρεπτικό υλικό + κύτταρα $\Rightarrow$ εξωκυτταρικά προϊόντα + περισσότερα κύτταρα

Ο ρυθμός ανάπτυξης λοιπόν μίας μικροβιακής καλλιέργειας είναι ευθέως ανάλογος της συγκέντρωσης των μικροβιακών κυττάρων που υπάρχουν σε αυτήν.

ΚΛΕΙΣΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Μια ορισμένου όγκου υγρή καλλιέργεια, όπου το θρεπτικό υπόστρωμα δεν ανανεώνεται αλλά και δεν αφαιρείται. Συνέπεια του παραπάνω είναι στο δοχείο καλλιέργειας να μειώνεται σταδιακά η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών και να αυξάνεται προοδευτικά αυτή των μικροοργανισμών και των παραγόμενων από αυτούς μεταβολικών προϊόντων με την πάροδο του χρόνου.

Η εξάντληση ενός τουλάχιστον θρεπτικού συστατικού του θρεπτικού υποστρώματος αλλά και η πιθανή συσσώρευση τοξικών για τον μικροοργανισμό μεταβολικών προϊόντων θα παρεμποδίσουν, από ένα σημείο και μετά, την αύξηση των μικροοργανισμών με συνέπεια την έλευση της στατικής φάσης και περαιτέρω της φάσης θανάτου της καλλιέργειας.

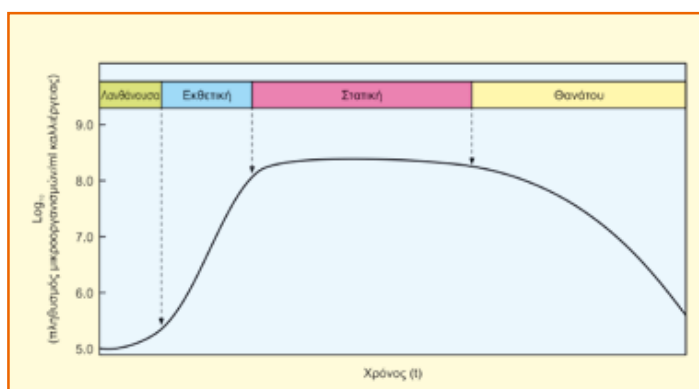
ΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Συνίσταται στην αύξηση ενός μικροβιακού πληθυσμού σε ένα δοχείο καλλιέργειας που τροφοδοτείται συνεχώς, με σταθερό ρυθμό, με νέο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό, ενώ ταυτόχρονα ένα μέρος του μείγματος της καλλιέργειας (μερικώς καταναλωθέν υπόστρωμα, μικροβιακά κύτταρα, εξωκυτταρικά προϊόντα) απομακρύνεται συνεχώς, και μάλιστα με τον ίδιο ρυθμό της τροφοδοσίας του θρεπτικού υλικού.



Κατά συνέπεια, ο πληθυσμός από τη μία μεριά δέχεται τη σταθερή ευνοϊκή επίδραση του νέου θρεπτικού υλικού, ενώ από την άλλη υφίσταται συνεχείς απώλειες από την απορροή μέρους της καλλιέργειας. Η εξισορρόπηση αυτή, των δύο αυτών αντίρροπων παραμέτρων με τον ρυθμό αύξησης του πληθυσμού, οδηγεί έπειτα από ορισμένο χρόνο το σύστημα σε σταθερή κατάσταση, όπου οι συγκεντρώσεις των μικροβιακών κυττάρων, των προϊόντων τους και των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος διατηρούνται σταθερές με το χρόνο. Αυτή η κατάσταση ισορροπίας του όλου συστήματος ονομάζεται **κατάσταση δυναμικής ισορροπίας**. Στην κατάσταση δυναμικής ισορροπίας ο μικροβιακός πληθυσμός αυξάνει εκθετικά σε συνάρτηση με το χρόνο, αλλά παραμένει από πλευράς αριθμού κυττάρων σταθερός με το χρόνο.

Α. ΦΑΣΕΙΣ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ



Εικ. 7.16: Φάσεις της κλειστής καλλιέργειας.

Λανθάνουσα φάση

Όταν ένα υγρό θρεπτικό υλικό εμβολιάζεται με ένα πλήθος μικροοργανισμών από μία άλλη καθαρή καλλιέργεια, οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν επιλεκτικά τα διαλυμένα θρεπτικά συστατικά και τα μετατρέπουν σε βιομάζα καθώς αυξάνουν σε μέγεθος και αναπαράγονται. Η λανθάνουσα φάση αρχίζει αμέσως μετά τον εμβολιασμό και αποτελεί μία περίοδο προσαρμογής των κυττάρων στο νέο περιβάλλον. Τα μικροβιακά κύτταρα προκειμένου να εκμεταλλευτούν τα θρεπτικά συστατικά του νέου υποστρώματος και γενικότερα να επιβιώσουν και να αυξηθούν στο νέο περιβάλλον πρέπει να εκφράσουν, εφόσον τα διαθέτουν, τα κατάλληλα γονίδια και πιθανόν να καταστείλουν την έκφραση κάποιων άλλων. Δηλαδή, η λανθάνουσα φάση είναι η χρονική περίοδος της καλλιέργειας που αντιστοιχεί στις διεργασίες οικοδόμησης των φυσιολογικών εκείνων μηχανισμών, που επιτρέπουν τελικά την εγκατάσταση στη μικροβιακή καλλιέργεια της χαρακτηριστικής ταχύτητας αύξησης του συγκεκριμένου μικροοργανισμού για τις δεδομένες συνθήκες. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής, η μάζα των κυττάρων μπορεί να αυξηθεί ελάχιστα, χωρίς όμως να αυξηθεί ο αριθμός των κυττάρων, γ' αυτό και ο ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας θεωρείται μηδενικός.

Είναι προφανές ότι η χρονική διάρκεια της λανθάνουσας φάσης αυξάνει, όσο μικρότερη είναι η προσαρμοστική ικανότητα στο συγκεκριμένο περιβάλλον των κυττάρων του εμβολίου.



Εκθετική φάση

Κατά τη φάση αυτή τα κύτταρα έχουν ήδη προσαρμοστεί στο νέο τους περιβάλλον και δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών συστατικών υπερκαλύπτουν τις ανάγκες των κυττάρων, ο ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας είναι ο μέγιστος και ανεξάρτητος της συγκέντρωσης των θρεπτικών συστατικών.

Έτσι λοιπόν η εκθετική φάση είναι η χρονική περίοδος που αντιστοιχεί στη μέγιστη ταχύτητα αύξησης του πληθυσμού των κυττάρων. Διαρκεί για όσο χρόνο οι συνθήκες στο βιοαντιδραστήρα είναι ιδανικές, χωρίς κανένα περιορισμό για τους μικροοργανισμούς.

Σε αυτή τη φάση ο πληθυσμός της καλλιέργειας κάθε χρονική στιγμή t μπορεί να περιγραφεί μαθηματικά από την εξίσωση:

$$N_t = N_0 \times 2^v$$

Όπου:

N_t = ο πληθυσμός της καλλιέργειας μετά από χρόνο t .

N_0 = ο πληθυσμός της καλλιέργειας τη χρονική στιγμή 0.

v = το πλήθος των διαιρέσεων, γενεών, που έχει πραγματοποιήσει ο πληθυσμός της καλλιέργειας μέσα σε χρόνο t .

Κάθε είδος μικροοργανισμού χαρακτηρίζεται από ένα ορισμένο χρόνο μέσα στον οποίο τα κύτταρα μπορούν να διαιρεθούν. Ο χρόνος αυτός ονομάζεται χρόνος διπλασιασμού ή χρόνος γενεάς. Ο χρόνος αυτός είναι ελάχιστος, όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε ιδανικές συνθήκες (pH, θερμοκρασία, κ.ά.). Σε διαφορετικές συνθήκες, ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι μεγαλύτερος του ελάχιστου με συνέπεια ο ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας να γίνεται μικρότερος.

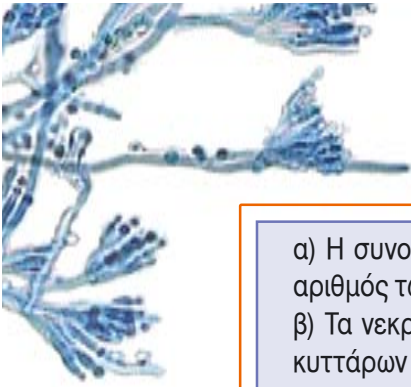
Στατική φάση

Η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων κατά την εκθετική φάση έχει ως συνέπεια τη μείωση των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος και την αύξηση της συγκέντρωσης κάποιου τοξικού πιθανόν προϊόντος των κυττάρων. Όταν ένα ή περισσότερα θρεπτικά συστατικά εξαντληθούν ή συσσωρευτούν τοξικά προϊόντα στο δοχείο καλλιέργειας, ο ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας επιβραδύνεται μέχρι που μηδενίζεται, οπότε η καλλιέργεια περνάει στη στατική φάση.

Κατά τη φάση στασιμότητας της καλλιέργειας, το δυσμενές περιβάλλον οδηγεί τα κύτταρα σε νέα ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων τους με στόχο να αυξήσουν τις πιθανότητες επιβίωσης στο εχθρικό περιβάλλον. Αποτέλεσμα είναι η παραγωγή από τα κύτταρα διαφόρων μεταβολικών προϊόντων, όπως π.χ. τα αντιβιοτικά. Στη φάση στασιμότητας ο πληθυσμός της καλλιέργειας έχει φτάσει στο μέγιστο δυνατό επίπεδο, αλλά ο ρυθμός αύξησης έχει μηδενιστεί. Εδώ τα κύτταρα παύουν να διαιρούνται και διαθέτουν όλη τους την ενέργεια για τη συντήρησή τους στη ζωή.



Κατά τη διάρκεια της φάσης στασιμότητας ισχύουν το ένα ή και τα δύο από τα παρακάτω:

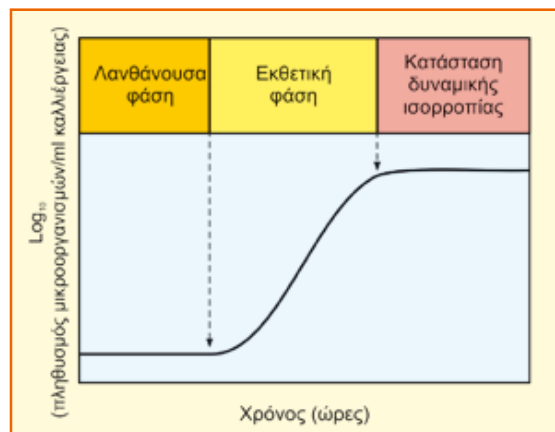


- α) Η συνολική συγκέντρωση των κυττάρων μπορεί να παραμένει σταθερή, αλλά ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων μειώνεται.
β) Τα νεκρά κύτταρα είναι δυνατόν να λυθούν. Τα προϊόντα της λύσης των νεκρών κυττάρων είναι δυνατόν να καταναλωθούν από τα ζωντανά κύτταρα.

Φάση θανάτου

Εδώ ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται συνεχώς, καθώς τα κύτταρα πεθαίνουν, διότι είτε η συγκέντρωση του θρεπτικού συστατικού που αποτελεί τον περιοριστικό για την αύξηση παράγοντα έχει μειωθεί τόσο που δεν αρκεί για να συντηρήσει όλο τον πληθυσμό των κυττάρων της στατικής φάσης, είτε η συγκέντρωση του τοξικού προϊόντος έχει αυξηθεί τόσο, ώστε να σκοτώνει τα κύτταρα. Ο θάνατος των κυττάρων μπορεί να οφείλεται βέβαια και σε συνδυασμό των παραπάνω γεγονότων καθώς και στο γεγονός ότι τα κύτταρα έχουν συμπληρώσει το μέγιστο χρόνο ζωής τους.

Β. ΦΑΣΕΙΣ ΣΥΝΕΧΟΥΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ



Εικ. 7.17: Φάσεις της συνεχούς καλλιέργειας.

Λανθάνουσα φάση

Ομοίως με την κλειστή καλλιέργεια.

Εκθετική φάση αύξησης

Όπως έχει περιγραφεί για την κλειστή καλλιέργεια, μόνο που επειδή έχουμε συνεχή ανανέωση του θρεπτικού υλικού, η καλλιέργεια δεν περνάει στη στατική φάση, παρά μόνο αν κάποια στιγμή διακόψουμε την παροχή νέου θρεπτικού υλικού, οπότε η συνεχής καλλιέργεια μεταπίπτει σε κλειστή.

Στη συνεχή καλλιέργεια, όταν η ταχύτητα αύξησης του πληθυσμού γίνει μέγιστη για τις δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας, τότε επιτυγχάνεται κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, δηλαδή η συγκέντρωση των κυττάρων παραμένει σταθερή με το χρόνο. Αυτό συμβαίνει διότι τα κύτταρα απομακρύνονται από την καλλιέργεια με ρυθμό ίσο με το ρυθμό ανάπτυξής τους και ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων είναι ίσος με την ταχύτητα αραίωσης της καλλιέργειας λόγω εισροής του φρέσκου θρεπτικού υλικού στο βιοαντιδραστήρα.

ΣΤΑΔΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Αρχικά γίνεται η επιλογή του κατάλληλου μικροοργανισμού, ο οποίος ανάλογα με το προϊόν που θέλουμε να παράγει, είναι δυνατό να υποστεί γενετική τροποποίηση με τις μεθόδους Γενετικής Μηχανικής ώστε να αποκτήσει τα επιθυμητά γονίδια, η έκφραση των οποίων θα δώσει τα επιθυμητά προϊόντα.

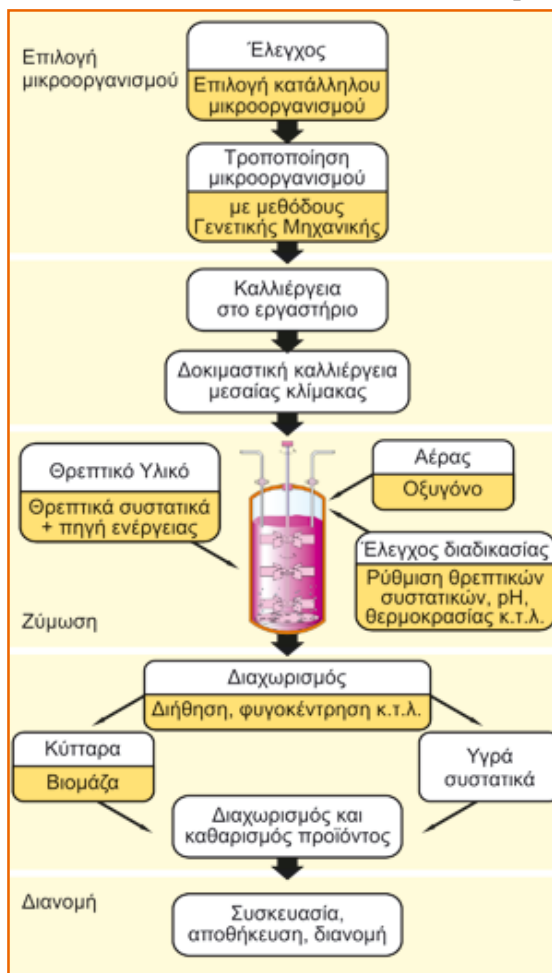
Ύστερα από αποστείρωση των εργαλείων και των συσκευών, γίνεται καλλιέργεια του μικροοργανισμού στο εργαστήριο. Στη συνέχεια, με την καλλιέργεια αυτή, εμβολιάζουμε μια μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα. Ο βιοαντιδραστήρας περιέχει θρεπτικό υλικό, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Τα θρεπτικά συστατικά αυτά είναι διαλυμένα σε H_2O και περιέχουν πηγή C, πηγή N και μεταλλικά ιόντα. Αν ο μικροοργανισμός είναι αερόβιος απαιτείται και υψηλή συγκέντρωση O_2 . Ο βιοαντιδραστήρας ή ζυμωτήρας, επιτρέπει τη ρύθμιση των συνθηκών pH, O_2 και θερμοκρασίας.

Μετά τη μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια, όπου έχει γίνει εφικτός ο πλήρης έλεγχος της καλλιέργειας, εμβολιάζεται βιομηχανικής κλίμακας βιοαντιδραστήρας, όπου αναπτύσσεται η καλλιέργεια.

Όταν παραχθεί το επιθυμητό προϊόν, το οποίο παράγεται στην εκθετική ή στατική φάση, σταματάει η ζύμωση και ξεκινάει η τελική κατεργασία, η οποία είναι διαδικασία καθαρισμού των προϊόντων της ζύμωσης.

Αρχικά γίνεται διαχωρισμός των υγρών από τα στερεά συστατικά στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα κύτταρα. Αυτό συνήθως γίνεται με διήθηση ή φυγοκέντρωση. Τα προϊόντα της ζύμωσης μπορεί να βρίσκονται είτε στα στερεά είτε στα υγρά συστατικά, από όπου παραλαμβάνονται με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων.

Τα προϊόντα της ζύμωσης μπορούν να αξιοποιηθούν μόνο όταν είναι απόλυτα καθαρά, δηλαδή όταν δεν έχουν προσμίξεις. Στη συνέχεια, τα προϊόντα συσκευάζονται, αποθηκεύονται και διανέμονται προς πώληση.



Εικ. 7.18: Στάδια παραγωγής προϊόντων με τη χρήση μικροοργανισμών.



Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

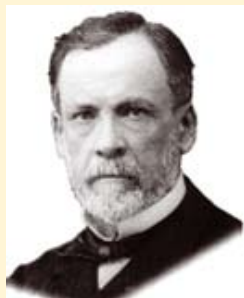
Η ανακάλυψη των μικροοργανισμών (οργανισμοί με μέγεθος $< 0,1\text{mm}$) είναι συνδεδεμένη με την ανακάλυψη του μικροσκοπίου. Ο πρώτος άνθρωπος που παρατήρησε μικροοργανισμούς ήταν ο Ολλανδός Antoni Van Leeuwenhoek, ο οποίος το 1684 χρησιμοποίησε το πρώτο απλό μικροσκόπιο δικής του κατασκευής, με το οποίο μπόρεσε να παρατηρήσει προκαρυωτικούς οργανισμούς. Ωστόσο, η κατανόηση της φύσης και της σημασίας των μικροοργανισμών ήρθε στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, μαζί με τη βελτίωση των μικροσκοπίων και την ανάπτυξη ορισμένων βασικών τεχνικών μελέτης των μικροοργανισμών.

Δύο περίπλοκες ερωτήσεις, που έρχονταν απαντήσεων στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, οδήγησαν στην ανάπτυξη αυτών των τεχνικών και στην ανακάλυψη της Μικροβιολογίας. Οι ερωτήσεις αυτές ήταν:

1. Υπάρχει αυτόματη γένεση;
2. Ποια είναι η φύση των λοιμωδών νοσημάτων;

Οι απαντήσεις αυτών των ερωτήσεων δόθηκαν από τους πατέρες της Μικροβιολογίας, το Γάλλο χημικό Louis Pasteur και το Γερμανό φυσικό Robert Koch.

LOUIS PASTEUR (1822-1895)



Ο L. Pasteur, πριν ασχοληθεί με τη Μικροβιολογία, μελέτησε την πορεία του πολωμένου φωτός, όταν αυτό περνάει μέσα από οργανικά μόρια και υπέθεσε τις ισομερείς μορφές των οργανικών μορίων. Στη συνέχεια ο Pasteur μελέτησε την αλκοολική ζύμωση και απέδειξε ότι η παραγωγή της αλκοόλης εξαρτάται από τον πληθυσμό των ζυμομυκήτων, που είναι ζωντανοί οργανισμοί και ευθύνονται για τις ζυμώσεις. Επίσης, προσδιόρισε ότι οι ασθένειες

των οίνων, οφείλονται σε βακτήρια. Για την πρόληψη των ασθενειών του οίνου εφάρμοσε μία τεχνική θέρμανσης τους, όπου λόγω της υψηλής θερμοκρασίας (63°C για 30' ή 72°C για 15'') τα βακτήρια θανατώνονται χωρίς να αλλοιώνονται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Η τεχνική αυτή που ονομάστηκε Παστερίωση, εφαρμόστηκε και στο γάλα και αποτέλεσε επανάσταση στην επιστήμη και τη βιομηχανία των τροφίμων.

Μνημειώδες έργο του Pasteur αποτελεί επίσης η κατάρριψη της επικρατούσας μέχρι τότε θεωρίας της αυτόματης γένεσης, σύμφωνα με την οποία η δημιουργία μικροοργανισμών γίνεται *de novo* (εξ αρχής) από οργανική ύλη. Ο Pasteur με ένα απλό πείραμα, απέδειξε ότι "η ζωή μόνο από ζωή προέρχεται" (*omne vivum ex vivo*).

Μέσα από τα πειράματα που πραγματοποίησε για την κατάρριψη της θεωρίας της αβιογένεσης, ο Pasteur ανέπτυξε αποτελεσματικές τεχνικές αποστείρωσης, που χωρίς αυτές η Μικροβιολογία ως επιστήμη δε θα ήταν δυνατό να αναπτυχθεί.



Ο L. Pasteur πραγματοποίησε πολλές ακόμη πρωτοποριακές έρευνες στη Μικροβιολογία, την Ιατρική και την Κτηνιατρική. Κορυφαίες ανάμεσα σε αυτές είναι η ανάπτυξη εμβολίων για τις βακτηριακές ασθένειες του άνθρακα, της χολέρας καθώς και της λύσσας που οφείλεται σε ιό. Ωστόσο ο Pasteur δε γνώριζε ακόμη την ύπαρξη των ιών, οι οποίοι ανακαλύφθηκαν το 1889 από τον Martin Beijerinck. Οι παραπάνω πρωτοποριακές μικροβιολογικές έρευνες και οι εφαρμογές τους στην Ιατρική και την Κτηνιατρική έθεσαν τα θεμέλια για την απόδειξη από τον R. Koch το 1884 (κριτήρια του Koch) ότι τα λοιμώδη νοσήματα προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς. Ο R. Koch (1843-1910) ανακάλυψε επίσης μεθόδους για την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε καθαρές καλλιέργειες (δημιουργία στερεών καλλιιεργειών με τη χρήση άγαρ).

Οι επιτυχίες του Pasteur οδήγησαν στη δημιουργία το 1885 του πρώτου κέντρου μικροβιολογικών ερευνών στον κόσμο: του ινστιτούτου Παστέρ.

Το 1905, δέκα χρόνια μετά το θάνατο του Pasteur, ο Koch θα τιμηθεί με ένα από τα πρώτα βραβεία Νόμπελ Ιατρικής ή Φυσιολογίας.

Η Μικροβιολογία έχει γίνει πλέον επιστήμη!



ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΚΜΑΘΗΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΩΡΙΑΣ



1. Ποσών ετών είναι η Βιοτεχνολογία;
(Απ.: Οι ζωντανοί ... εμβολίων. σελ.107)
2. Τι όρισε ο Kark Ereky με τον όρο Βιοτεχνολογία;
(Απ.: Ο όρος Βιοτεχνολογία ... ζωντανών οργανισμών». σελ. 107)
3. Τι εννοούμε σήμερα λέγοντας Βιοτεχνολογία και ποια είναι η ευρεία έννοιά της;
(Απ.: Σήμερα ... προϊόντων. και Βιοτεχνολογία ... του ανθρώπου. σελ. 107)
4. Σε ποιους τομείς συνεισφέρει σήμερα η Βιοτεχνολογία; Να δώσετε κάποια παραδείγματα προϊόντων.
(Απ.: Η Βιοτεχνολογία συνεισφέρει ... περιβάλλοντος. και Τέτοια ... βακτήρια. σελ.107)
5. Σε ποιες τεχνικές στηρίζεται η Βιοτεχνολογία και πώς οι τεχνικές αυτές βρίσκουν εφαρμογή στη Βιοτεχνολογία;
(Απ.: Η Βιοτεχνολογία στηρίζεται ... παρελθόν. σελ.107)
6. Ποια είναι τα νέα στοιχεία που εισάγει η επιστήμη της Βιοτεχνολογίας;
(Απ.: Το νέο ... υλοποίησή τους. και Οι νέες ... διλήμματα. σελ.107)
7. Τι συμβαίνει όταν οι μικροοργανισμοί βρεθούν σε περιβάλλον με κατάλληλες συνθήκες;
(Απ.: Οι μικροοργανισμοί ... αρχικό κύτταρο. σελ. 108)
8. Τι είναι ο ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροβίων και από τι καθορίζεται;
(Απ.: Ο ρυθμός ανάπτυξης ... διπλασιασμού. σελ. 108)
9. Ποιοι παράγοντες επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού μιας καλλιέργειας μικροοργανισμών;
(Απ.: Οι παράγοντες ... θερμοκρασία. σελ. 108)
10. Ποια είναι τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που πρέπει να προμηθεύεται ένας μικροοργανισμός από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται;
(Απ.: Όπως και όλοι ... ιόντα. σελ. 108)
11. Ποια είναι η κατάλληλη πηγή άνθρακα κάθε φορά για κάθε μικροοργανισμό, ανάλογα με το αν φωτοσυνθέτει ή όχι;
(Απ.: Η πηγή άνθρακα ... υδατάνθρακες. σελ. 108)
12. Σε ποια χημική μορφή το άζωτο καθιστάται εύληπτο από τους μικροοργανισμούς;
(Απ.: Η πηγή αζώτου ... (NO₃⁻). σελ. 108)
13. Γιατί οι μικροοργανισμοί πρέπει να προμηθεύονται μεταλλικά ιόντα;
(Απ.: Τέλος ... μορίων. σελ. 108)
14. Πώς το pH επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών;
(Απ.: Το pH ... 4-5. σελ. 108)



15. Με ποιον τρόπο επηρεάζει η παρουσία οξυγόνου την ανάπτυξη των μικροοργανισμών;
(Απ.: Η παρουσία ... αναερόβιοι. σελ. 108)
16. Πώς η θερμοκρασία του περιβάλλοντος καθορίζει τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών;
(Απ.: Η θερμοκρασία ... 20° C. σελ. 108)
17. Ποιος ήταν ο πρωτοπόρος της καλλιέργειας των μικροοργανισμών στο εργαστήριο και ποιες παραμέτρους προσδιόρισε ως απαραίτητες για το σκοπό αυτό;
(Απ.: Οι επιστήμονες ... συνθηκών ανάπτυξης. σελ. 109)
18. Τι πρέπει να περιέχουν τα τεχνητά θρεπτικά υλικά, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο εργαστήριο και σε ποιες κατηγορίες διακρίνονται;
(Απ.: Σήμερα οι μικροοργανισμοί ... μικρότερες θερμοκρασίες. σελ. 109)
19. Ποια είναι τα βήματα που ακολουθούνται για την καλλιέργεια ενός μικροοργανισμού στο εργαστήριο;
(Απ.: Μια καλλιέργεια ... έναρξη της καλλιέργειας. σελ. 109)
20. Πώς ονομάζονται οι συσκευές που χρησιμοποιούνται για να αναπτυχθεί μια καλλιέργεια μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα και ποιο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιείται;
(Απ.: Όταν γίνεται καλλιέργεια ... σακχαρότευτλων. σελ. 109)
21. Ποια είναι τα βήματα που ακολουθούνται για να αναπτυχθεί μια καλλιέργεια σε βιομηχανική κλίμακα;
(Απ.: Η καλλιέργεια ... χρήση. σελ. 109)
22. Ποια διαδικασία ονομάζουμε ζύμωση; Ποια μπορεί να είναι τα προϊόντα της;
(Απ.: Με τον όρο ζύμωση ... αντιβιοτικά. σελ. 109)
23. Ποιες είναι οι φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε μια κλειστή καλλιέργεια; Περιγράψτε τι συμβαίνει σε κάθε φάση.
(Απ.: Υπάρχουν ... ανάπτυξή τους. σελ. 110-111)
24. Ποια καλλιέργεια ονομάζεται συνεχής;
(Απ.: Συνεχής ... προϊόντα. σελ. 111)
25. Με ποιον τρόπο γίνεται η παραλαβή των προϊόντων της ζύμωσης από έναν βιοαντιδραστήρα;
(Απ.: Τελική ... προσμείξεις. σελ. 111)
26. Περιγράψτε τα στάδια παραγωγής προϊόντων με τη χρήση μικροοργανισμών.
(Απ.: Περιγραφή εικόνας σχολικού βιβλίου 7.5 σελ. 111, βλέπε και ένθετο παρόντος βιβλίου, Στάδια Παραγωγής Προϊόντων με τη χρήση Μικροοργανισμών)
27. Γιατί η παραγωγή πενικιλίνης είναι σημαντική για τον άνθρωπο;
(Απ.: Η ανακάλυψη ... ποτά. σελ. 111-112)
28. Από τι εξαρτάται η παραγωγή πενικιλίνης σε βιοαντιδραστήρα;
(Απ.: Η πενικιλίνη ... καλλιέργειας. σελ. 112)
29. Περιγράψτε τη διαδικασία παραγωγής πενικιλίνης σε βιομηχανική κλίμακα.
(Απ.: Στελέχη ... μέθοδοι. σελ. 112)



ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΚΛΕΙΣΤΟΥ ΤΥΠΟΥ



Να βάλετε σε κύκλο το γράμμα που αντιστοιχεί στη σωστή απάντηση ή στη φράση που συμπληρώνει σωστά την πρόταση:

1. Η Βιοτεχνολογία χρησιμοποιεί διαδικασίες με τις οποίες εισάγονται νέες ιδιότητες στους οργανισμούς. Για τις διαδικασίες αυτές χρησιμοποιούνται

- A. ένζυμα DNA ελικάσες.
- B. πλασμίδια.
- Γ. ιοειδή.
- Δ. ολόκληρο το γονιδίωμα των βακτηρίων.

2. Ως βιοτεχνολογική διαδικασία θεωρείται η

- A. εισαγωγή νέων γονιδίων στα φυτά.
- B. διαδικασία σύνθεσης χημικών εντομοκτόνων.
- Γ. διαδικασία παραγωγής βενζίνης.
- Δ. διαδικασία παρασκευής πλαστικών.

3. Με τη Βιοτεχνολογία μπορεί να παραχθούν προϊόντα όπως

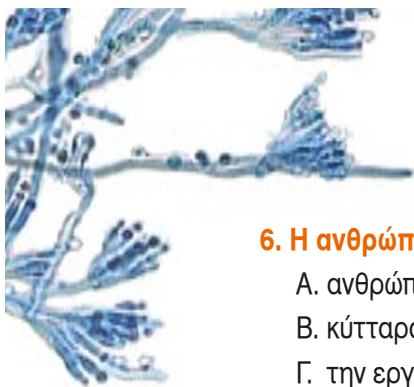
- A. μύρα, κρασί, τυρί, μαγιά.
- B. χημικά εντομοκτόνα.
- Γ. ασπιρίνη.
- Δ. μεταλλεύματα.

4. Οι μικροοργανισμοί είναι

- A. πάντα βλαβεροί για τον άνθρωπο.
- B. πάντα ωφέλιμοι για τον άνθρωπο.
- Γ. ορισμένοι είναι βλαβεροί και ορισμένοι είναι ωφέλιμοι.
- Δ. πάντοτε παθογόνοι.

5. Τα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια

- A. υπάρχουν φυσιολογικά ελεύθερα στη φύση.
- B. είναι αυτά στα οποία ο άνθρωπος έχει εισάγει νέες γενετικές πληροφορίες.
- Γ. παράγουν τις ίδιες πρωτεΐνες με τον άνθρωπο.
- Δ. δεν απαιτούν αποστείρωση για την καλλιέργειά τους.



6. Η ανθρώπινη ινσουλίνη που χρησιμοποιούν σήμερα οι διαβητικοί προέρχεται από

- A. ανθρώπινα κύτταρα.
- B. κύτταρα θηλαστικών.
- Γ. την εργαστηριακή σύνθεσή της από τα αμινοξέα που την αποτελούν.
- Δ. γενετικά τροποποιημένα βακτήρια.

7. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, που χρησιμοποιεί η Βιοτεχνολογία, απαιτεί

- A. διαθεσιμότητα θρεπτικών υλικών που περιέχουν άνθρακα.
- B. υποχρεωτική παρουσία οξυγόνου.
- Γ. θερμοκρασίες υποχρεωτικά πολύ υψηλές.
- Δ. pH πάντα μεταξύ 6-8.

8. Στα θρεπτικά συστατικά όλων των μικροοργανισμών περιλαμβάνονται απαραίτητως

- A. υδατάνθρακες.
- B. μεταλλικά ιόντα.
- Γ. ορμόνες.
- Δ. πρωτεΐνες.

9. Μεταξύ των προϊόντων της Βιοτεχνολογίας περιλαμβάνονται

- A. οι βενζίνες.
- B. τα χημικά εντομοκτόνα.
- Γ. το κρασί.
- Δ. το φυσικό καουτσούκ.

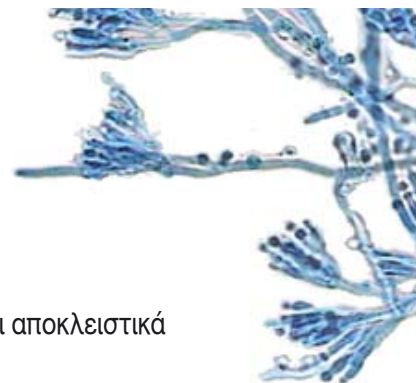
10. Τα ετερότροφα βακτήρια της Βιοτεχνολογίας προμηθεύονται τον άνθρακα από

- A. τις πρωτεΐνες.
- B. τους υδατάνθρακες.
- Γ. το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας.
- Δ. το διοξείδιο του άνθρακα των αμινοξέων.

11. Με τις τεχνικές της Βιοτεχνολογίας εισάγονται νέες ιδιότητες στους οργανισμούς.

Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται

- A. ολόκληρο το γονιδίωμα του δότη.
- B. το γονίδιο του δότη που φέρει την επιθυμητή γενετική οδηγία.
- Γ. το επιθυμητό γονίδιο συνδεδεμένο με ένα ριβόσωμα.
- Δ. οποιοδήποτε τμήμα του γονιδιώματος του δότη.



12. Τροποποιημένος γενετικός οργανισμός σημαίνει ότι έχει

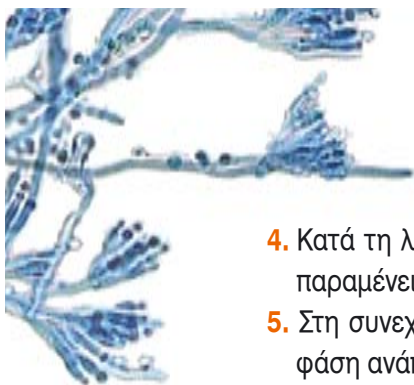
- A. διασταυρωθεί με ένα άλλο οργανισμό με βελτιωμένες ιδιότητες.
- B. εισαχθεί στο DNA του όλο το DNA από ένα άλλο οργανισμό, που ανήκει αποκλειστικά στο ίδιο είδος με αυτόν.
- Γ. εισαχθεί στο DNA του κάποιο γονίδιο, που του προσφέρει νέες ιδιότητες.
- Δ. εισαχθεί στο ή στα κύτταρά του, ένα γονιδιακό προϊόν, με τη βοήθεια ειδικού φορέα.

Να χαρακτηρίσετε με Σ (σωστό) ή με Λ (λάθος) τις παρακάτω προτάσεις:

	Σ	Λ
1. Ο Πάστερ υπήρξε ο πρωτοπόρος για την ανάπτυξη του κλάδου της Βιοτεχνολογίας.	☐	☐
2. Οι μικροοργανισμοί είναι πάντα επικίνδυνοι για τον άνθρωπο.	☐	☐
3. Με την καλλιέργεια των μικροοργανισμών μπορούμε να πάρουμε πολλά χρήσιμα προϊόντα, όπως ποτά και τρόφιμα.	☐	☐
4. Η Βιοτεχνολογία είναι ένας διεπιστημονικός κλάδος (συνδυασμός επιστήμης και τεχνολογίας).	☐	☐
5. Η Μικροβιολογία αποτελεί τη βάση της Βιοτεχνολογίας.	☐	☐
6. Για να παραχθεί το ανασυνδυασμένο DNA χρησιμοποιούνται διάφοροι φορείς, όπως πλασμίδια και ιοί.	☐	☐
7. Μια από τις πιο παλιές βιοτεχνολογικές μεθόδους είναι η παρασκευή ψωμιού.	☐	☐
8. Η ζύμωση είναι βιοτεχνολογική διαδικασία.	☐	☐
9. Εκθετική είναι η φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών κατά την οποία ο πληθυσμός δεν αυξάνεται.	☐	☐
10. Στις κλειστές καλλιέργειες οι μικροοργανισμοί βρίσκονται συνεχώς σε εκθετική φάση ανάπτυξης.	☐	☐
11. Η παραγωγή της πενικιλίνης γίνεται στους βιοαντιδραστήρες.	☐	☐

Να συμπληρώσετε με τους κατάλληλους όρους τα κενά στις παρακάτω προτάσεις:

- 1. Η ανθρώπινη ινσουλίνη παράγεται από τροποποιημένα βακτήρια.
- 2. Με τη βοήθεια της Βιοτεχνολογίας εισάγονται νέες ιδιότητες στους ζωντανούς οργανισμούς.
- 3. Η πηγή άνθρακα για τους αυτότροφους οργανισμούς είναι της ατμόσφαιρας.



4. Κατά τη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας των μικροβίων ο πληθυσμός παραμένει
5. Στη συνεχή καλλιέργεια οι μικροοργανισμοί βρίσκονται συνεχώς σε φάση ανάπτυξης.
6. Στην κλειστή καλλιέργεια οι φάσεις ανάπτυξης είναι η λανθάνουσα, η εκθετική, η στατική και η φάση
7. Στην εκθετική φάση ανάπτυξης ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται
8. Στη φάση ανάπτυξης, ο πληθυσμός των βακτηρίων δεν αυξάνεται λόγω της εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών του υλικού καλλιέργειας.
9. Για τα αναερόβια βακτήρια η παρουσία του οξυγόνου είναι παράγοντας
10. Οι βιοαντιδραστήρες επιτρέπουν των συνθηκών μιας καλλιέργειας.

Να αντιστοιχίσετε τους όρους που αναγράφονται στη στήλη I με τις έννοιες ή τις φράσεις που αναγράφονται στη στήλη II. Για το σκοπό αυτό να γράψετε δίπλα από κάθε γράμμα της στήλης I τον αριθμό που ταιριάζει από τη στήλη II (π.χ. A-1).

I	II
A. ____ Αερόβιοι οργανισμοί B. ____ Πηγή αζώτου για καλλιέργειες μικροοργανισμών Γ. ____ Βιομάζα Δ. ____ Βιοαντιδραστήρας Ε. ____ Ζύμωση Ζ. ____ Εμβολιασμός	1. Διαδικασία ανάπτυξης μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό. 2. Απαιτούν παρουσία οξυγόνου. 3. Συσκευές ζύμωσης. 4. Αμμωνιακά ή νιτρικά ιόντα. 5. Προϊόντα της ζύμωσης.

I	II
A. ____ Συνεχής καλλιέργεια B. ____ Φυγοκέντρωση Γ. ____ Λανθάνουσα φάση ανάπτυξης Δ. ____ Πενικιλίνη	1. Μέθοδος διαχωρισμού υγρών. 2. Ο πληθυσμός των οργανισμών της καλλιέργειας παραμένει σταθερός. 3. Παράγεται από μύκητες. 4. Καλλιέργεια που τροφοδοτείται συνεχώς με θρεπτικό υλικό. 5. Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών μειώνεται.



ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΙΚΑ ΑΠΑΝΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ



A. Να απαντήσετε σε καθεμία από τις παρακάτω ερωτήσεις:

1. Να αναφέρετε τις τεχνικές που αποτελούν το θεμέλιο της Βιοτεχνολογίας.

Η Βιοτεχνολογία περιλαμβάνει όλες τις δράσεις που αφορούν αξιοποίηση των ιδιοτήτων των ζωντανών οργανισμών για την παραγωγή νέων προϊόντων και τη βελτίωση των υπαρχόντων. Η Βιοτεχνολογία, αποτελεί διεπιστημονική προσέγγιση βασικών επιστημονικών κλάδων, όπως της Μικροβιολογίας, της Μοριακής Βιολογίας κ.ά. Επομένως οι βασικές τεχνικές της Βιοτεχνολογίας είναι οι τεχνικές της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στο εργαστήριο και σε βιομηχανική κλίμακα σε καθαρές καλλιέργειες υγρές ή στερεές, καθώς και οι τεχνικές της Γενετικής Μηχανικής που επιτρέπουν τη γενετική τροποποίηση των κυττάρων.

2. Πώς προμηθεύονται τον άνθρακα οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί;

Αυτότροφοι είναι οι μικροοργανισμοί που μπορούν να παράγουν μόνοι τους τις χημικές ουσίες από τις οποίες εξασφαλίζεται η απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωσή τους. Οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν ως κύρια ή μόνη πηγή, άνθρακα, το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας και δεν απαιτούν στο θρεπτικό τους υλικό οργανική πηγή άνθρακα.

3. Ποιες είναι οι πηγές του άνθρακα για τους ετερότροφους μικροοργανισμούς;

Οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί αδυνατούν να παράγουν μόνοι τους την ενέργεια που χρειάζονται γι' αυτό προσλαμβάνουν μέσω διαφόρων οργανικών ενώσεων, συνήθως υδτανθράκων, από το θρεπτικό τους υλικό, τις χημικές ουσίες που είναι απαραίτητες για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών.

4. Να αναφέρετε τους τομείς στους οποίους συνεισφέρει η Βιοτεχνολογία.

Η Βιοτεχνολογία εδώ και χιλιάδες χρόνια συνεισφέρει στην καθημερινή ζωή και τη διατροφή του ανθρώπου αφού οι πρόγονοί μας χρησιμοποιούσαν τις ιδιότητες και τις δυνατότητες των μικροοργανισμών για να παράγουν διάφορα προϊόντα, όπως ψωμί, τυρί, οίνο κ.ά. Τα τελευταία 25 χρόνια, με την εξέλιξη των μοριακών τεχνικών και τις δυνατότητες μας να κατανοήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς των κυττάρων, έχει γίνει δυνατή η αξιοποίηση και η συνεισφορά της Βιοτεχνολογίας σε διάφορους τομείς όπως στην Ιατρική, στη Γεωπονία (γεωργία και κτηνοτροφία), στη Βιομηχανία και στην προστασία του περιβάλλοντος (βλέπε κεφ. 8, 9, 10, 11 αντίστοιχα).



5. Να αναφέρετε τους παράγοντες που επηρεάζουν τον χρόνο διπλασιασμού των μικροοργανισμών.

Χρόνος διπλασιασμού των μικροοργανισμών είναι ο χρόνος τον οποίο χρειάζονται για να διαιρεθούν τα κύτταρά τους, δηλαδή είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί για την παραγωγή δύο θυγατρικών κυττάρων από ένα μητρικό κύτταρο. Ο χρόνος αυτός είναι σταθερός κάτω από σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος και ο ελάχιστος χρόνος διπλασιασμού είναι χαρακτηριστικός για κάθε είδος μικροοργανισμού. Π.χ. σε οποιεσδήποτε συνθήκες και αν η καλλιέργηθεί το βακτήριο *E. coli* δεν μπορεί να διπλασιαστεί σε λιγότερο από 20 λεπτά. Τα 20 λεπτά είναι ο ελάχιστος χρόνος διπλασιασμού για το *E. coli* και επιτυγχάνεται μόνο σε άριστες συνθήκες καλλιέργειας. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού των μικροοργανισμών και συνεπώς τον ρυθμό ανάπτυξής τους είναι η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματός τους, ο αερισμός, η θερμοκρασία και το pH.

6. Τι είναι οι βιοαντιδραστήρες;

Οι βιοαντιδραστήρες είναι κατάλληλες συσκευές όπου γίνονται ζυμώσεις σε βιομηχανική κλίμακα. Επιτρέπουν τον έλεγχο και τη ρύθμιση των συνθηκών της καλλιέργειας (βλέπε και αντίστοιχο όρο).

7. Να ονομάσετε τις συσκευές στις οποίες καλλιεργούνται οι μικροοργανισμοί σε βιομηχανική κλίμακα.

Ζυμωτήρες ή βιοαντιδραστήρες (βλέπε και ερώτηση 6).

8. Να ονομάσετε τον πρωτοπόρο επιστήμονα που εισήγαγε την έννοια της καλλιέργειας των βακτηρίων.

Ο Γάλλος χημικός Λουί Παστέρ (Louis Pasteur 1822-1895) υπήρξε ο πατέρας της Μικροβιολογίας. Ο L. Pasteur μελέτησε την αλκοολική ζύμωση και προσδιόρισε ότι η παραγωγή της αλκοόλης εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ζυμομύκητων. Επίσης απέδειξε ότι οι ασθένειες του οίνου οφείλονται σε βακτήρια. Ανέπτυξε την τεχνική της Παστερίωσης (72°C για 15") για τη συντήρηση των τροφίμων και παρασκεύασε εμβόλιο για πολλά λοιμώδη νοσήματα όπως ο άνθρακας και η λύσσα. Μνημειώδες έργο του αποτελεί επίσης η κατάρριψη της θεωρίας της αυτόματης γένεσης (βλέπε και η Ιστορία της Μικροβιολογίας).

9. Πώς ονομάζεται η διαδικασία ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό;

Η διαδικασία αυτή ονομάζεται ζύμωση. Παλαιότερα ο όρος αυτός αναφερόταν μόνο σε αναερόβιες διαδικασίες (π.χ. ζύμωση του μούστου από ζυμομύκητα απουσία αέρα), σήμερα όμως περιλαμβάνει όλες τις διαδικασίες ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό, είτε αυτές πραγματοποιούνται παρουσία O_2 είτε απουσία O_2 .



10. Να αναφέρετε τα προϊόντα της ζύμωσης.

Τα προϊόντα της ζύμωσης είναι είτε τα ίδια τα κύτταρα, ζωντανά ή νεκρά, που ονομάζονται βιομάζα, είτε τα προϊόντα των κυττάρων, ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά, όπως διάφορες πρωτεΐνες ή χημικές ουσίες όπως τα αντιβιοτικά.

11. Να αναφέρετε σε τι διαφέρουν οι κλειστές από τις συνεχείς (ανοιχτές) καλλιέργειες.

Κλειστή καλλιέργεια είναι μία υγρή μικροβιακή καλλιέργεια, στην οποία δεν γίνεται ανανέωση του θρεπτικού υλικού, ούτε απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων και των προϊόντων της καλλιέργειας. Έτσι οι μικροοργανισμοί αντιμετωπίζουν ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον με αποτέλεσμα η καλλιέργεια να διέρχεται διαδοχικά από τη λανθάνουσα, την εκθετική, τη στατική και τη φάση θανάτου.

Από την άλλη πλευρά σε μία συνεχή καλλιέργεια, το περιβάλλον ανάπτυξης των μικροοργανισμών διατηρείται συνεχώς σταθερό καθώς το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας ανανεώνεται με σταθερό ρυθμό και ταυτόχρονα με τον ίδιο ρυθμό απομακρύνεται μέρος της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός των μικροοργανισμών να βρίσκεται μετά τη λανθάνουσα φάση συνεχώς στην εκθετική φάση αλλά ο πληθυσμός τους στον βιοαντιδραστήρα να διατηρείται σταθερός με το χρόνο. Έτσι η συνεχής καλλιέργεια είναι κατάλληλη για την παραγωγή μεγάλου όγκου βιομάζας ή για την παραλαβή μικροβιακών προϊόντων που παράγονται κατά την εκθετική φάση αύξησης των μικροοργανισμών (πρωτογενείς μεταβολίτες). Αντίθετα η συνεχής καλλιέργεια δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή προϊόντων που παράγονται από τα κύτταρα κατά τη φάση στασιμότητας. Κάτι τέτοιο είναι εφικτό μόνο σε μία κλειστή καλλιέργεια όπου οι μικροοργανισμοί διέρχονται από τη στατική φάση.

12. Με ποιες τεχνικές παραλαμβάνονται τα προϊόντα της ζύμωσης;

Τελική κατεργασία είναι η διεργασία καθαρισμού του προϊόντος της ζύμωσης που παραλαμβάνεται από τον βιοαντιδραστήρα. Αρχικά γίνεται διαχωρισμός των υγρών από τα στερεά συστατικά. Αυτό γίνεται συνήθως με διήθηση ή φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια προκειμένου να πάρουμε το προϊόν απόλυτα καθαρό χωρίς προσμείξεις, εφαρμόζουμε διάφορες τεχνικές καθαρισμού όπως π.χ. χρωμογραφία, εκχύλιση, απόσταξη κ.ά (βλέπε ένθετο, Στάδια παραγωγής προϊόντων με τη χρήση μικροοργανισμών).

13. Να αναφέρετε τον λόγο για τον οποίο αποστειρώνονται οι συσκευές καλλιέργειας πριν την έναρξη της καλλιέργειας μικροοργανισμών.

Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού γύρω μας, στο περιβάλλον του εργαστηρίου, οπουδήποτε. Προκειμένου λοιπόν να διασφαλίσουμε ότι στο θρεπτικό υπόστρωμα που εμβολιάσαμε θα αναπτυχθεί καθαρή καλλιέργεια του επιθυμητού μόνο μικροοργανισμού είναι απολύτως αναγκαίο να τηρούνται συνθήκες ασηψίας σε κάθε χειρισμό της μικροβιακής μας καλλιέργειας. Έτσι είναι απολύτως απαραίτητο να αποστειρώνονται οι συσκευές καλλιέργειας πριν τον εμβολιασμό, όπως και κάθε άλλο μικροβιακό εργαλείο, αποτρέποντας έτσι τη μόλυνση της καλλιέργειας μας από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς.



14. Ποια υλικά είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη σε τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα των μικροοργανισμών και σε τι χρησιμεύει το κάθε ένα από αυτά;

Όπως και όλοι οι υπόλοιποι οργανισμοί, για να αναπτυχθεί ένας μικροοργανισμός είναι απαραίτητο να μπορεί να προμηθεύεται από το περιβάλλον, στο οποίο αναπτύσσεται, μία σειρά θρεπτικών συστατικών. Σε αυτά περιλαμβάνονται το H_2O , ο C, το N και διάφορα μεταλλικά ιόντα.

Η πηγή C για τους αυτότροφους μικροοργανισμούς, που είναι ικανοί να προσλαμβάνουν ενέργεια από το φως, είναι το CO_2 της ατμόσφαιρας το οποίο τους παρέχει τα απαραίτητα άτομα C, για την κατασκευή των ανθρακικών σκελετών των βιολογικών μακρομορίων τους. Για τους ετερότροφους μικροοργανισμούς η πηγή άνθρακα είναι ταυτόχρονα και πηγή ενέργειας και είναι κατά κανόνα διάφορες οργανικές ενώσεις όπως οι υδατάνθρακες.

Η πηγή N, απαραίτητο στοιχείο για το σχηματισμό πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων, είναι για τους περισσότερους μικροοργανισμούς τα NH_4^+ και τα NO_3^- ιόντα. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί, με εξαίρεση τους αζωτοδεσμευτικούς (βλέπε Βιολογία Γενικής Παιδείας Γ' Λυκείου, κύκλος του N), είναι αναγκαίο να προσλαμβάνουν άζωτο στις παραπάνω εύληπτες μορφές.

Τέλος, τα μεταλλικά ιόντα είναι απαραίτητα για την πραγματοποίηση των βιοχημικών αντιδράσεων των κυττάρων και ως συστατικά διαφόρων μορίων. Επίσης ορισμένα άλατα, χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση του pH του θρεπτικού υλικού.

Τα τεχνητά θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο εργαστήριο μπορεί να είναι υγρά ή στερεά. Τα υγρά θρεπτικά υλικά περιέχουν όλα τα θρεπτικά συστατικά που αναφέρθηκαν προηγουμένως διαλυμένα σε H_2O . Τα στερεά θρεπτικά υλικά παρασκευάζονται με ανάμιξη του υγρού θρεπτικού υλικού με άγαρ ώστε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

15. Πώς καθορίζεται ο ρυθμός ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού;

Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών καθορίζεται από τον χρόνο διπλασιασμού, δηλαδή από τον ρυθμό με τον οποίο διαιρούνται τα κύτταρα του στις δεδομένες συνθήκες της καλλιέργειας. Κάθε είδος μικροοργανισμού έχει χαρακτηριστικό χρόνο διπλασιασμού για δεδομένες συνθήκες.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού, και κατά συνέπεια το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών, είναι η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, το pH, το O_2 και η θερμοκρασία.

Όταν το περιβάλλον ανάπτυξης της μικροβιακής καλλιέργειας είναι άριστο τότε επιτυγχάνεται ο ελάχιστος χρόνος διπλασιασμού των μικροοργανισμών, δηλαδή ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας. Όσο οι συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας απομακρύνονται από το άριστο, τόσο αυξάνει ο χρόνος διπλασιασμού των μικροοργανισμών, συνεπώς, τόσο μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας.

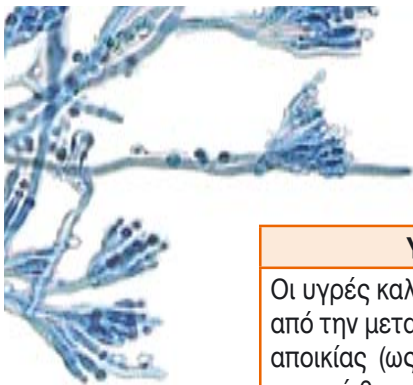


16. Συγκρίνετε την υγρή με τη στερεή καλλιέργεια. Πότε επιλέγουμε τη μια μορφή καλλιέργειας και πότε την άλλη;

Υγρή μικροβιακή καλλιέργεια είναι η ανάπτυξη ενός είδους ή ενός στελέχους μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό.

Στερεή μικροβιακή καλλιέργεια είναι η ανάπτυξη ενός είδους ή ενός στελέχους μικροοργανισμών σε στερεοποιημένο με άγαρ υγρό θρεπτικό υλικό.

ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
Υγρό θρεπτικό υλικό.	Στερεό θρεπτικό υλικό.
Δεν περιέχει άγαρ ή άλλο πηκτικό παράγοντα.	Περιέχει συνήθως άγαρ ή κάποιον άλλο πηκτικό παράγοντα.
Περιέχεται σε δοχεία καλλιέργειας (π.χ. κωνικές φιάλες, δοκιμαστικούς σωλήνες, βιοαντιδραστήρες κ.ά.).	Περιέχεται σε γυάλινα ή πλαστικά τρυβλία και δοκιμαστικούς σωλήνες.
Το θρεπτικό υλικό μπορεί να ανανεώνεται.	Δεν μπορεί να γίνει ανανέωση θρεπτικού υλικού.
Μπορεί να γίνεται απομάκρυνση μέρους της καλλιέργειας και μαζί απομάκρυνση μέρους των παραγόμενων μεταβολιτών.	Δεν μπορεί να γίνει απομάκρυνση μεταβολιτών.
Τα ζωντανά κύτταρα αιωρούνται στο θρεπτικό μέσο και μετακινούνται με την ανανέωση του θρεπτικού υλικού.	Τα κύτταρα δημιουργούν αποικίες καθώς όλοι οι απόγονοι ενός αρχικού μικροοργανισμού παραμένουν προσκολλημένοι στο ίδιο σημείο λόγω αδυναμίας μετακίνησής τους στο στερεό θρεπτικό υλικό.
Ανάλογα με το χρώμα, την οσμή, την ύπαρξη φυσαλίδων κ.ά. μπορούμε να κάνουμε αδρές εκτιμήσεις για το είδος ή το στέλεχος του αναπτυσσόμενου μικροοργανισμού.	Ανάλογα με τα μορφολογικά (χρώμα, σχήμα, μέγεθος, υφή) και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά μιας αποικίας, μπορούμε να προσδιορίσουμε το είδος ή το στέλεχος του αναπτυσσόμενου μικροοργανισμού. (Θυμηθείτε τις αδρές και τις λείες αποικίες του βακτηρίου <i>Diplococcus pneumoniae</i> στο πείραμα του Griffith βλέπε κεφ. 1).
Παράγεται μεγάλη ποσότητα βιομάζας και μεταβολιτών.	Παράγεται περιορισμένη βιομάζα και ποσότητα μεταβολιτών.
Είναι αδύνατη ή εξαιρετικά δύσκολη η επιλογή ορισμένων κυττάρων που φέρουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά από μία υγρή καλλιέργεια.	Είναι εύκολη η επιλογή μεμονωμένης αποικίας μικροοργανισμών που φέρουν ορισμένα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. (Θυμηθείτε την επιλογή με βάση την ικανότητα ανάπτυξης τους σε στερεά θρεπτικά υλικά που περιέχουν ορισμένο αντιβιοτικό, των μετασχηματισμένων από τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια, στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA βλέπε κεφ. 4).



ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
Οι υγρές καλλιέργειες μπορεί να προκύψουν από την μεταφορά ορισμένων κυττάρων μίας αποικίας (ως εμβόλιο) που αναπτύχθηκε σε στερεό θρεπτικό υλικό.	Οι στέρεες καλλιέργειες μπορεί να προκύψουν από την επίστρωση υγρών καλλιεργειών σε στερεό θρεπτικό υλικό.

Η επιλογή της μίας ή της άλλης μορφής καλλιέργειας εξαρτάται κάθε φορά από τον στόχο που θέλουμε να επιτύχουμε. Εάν π.χ. θέλουμε να απομονώσουμε τα μετασχηματισμένα με το ανασυνδυασμένο DNA κύτταρα-ξενιστές, θα πρέπει να δημιουργήσουμε μια στέρεη καλλιέργεια που να περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Εάν όμως θέλουμε να πάρουμε μεγάλες ποσότητες από την ετερόλογη πρωτεΐνη που είναι ικανά να παράγουν αυτά τα μετασχηματισμένα κύτταρα, τότε πρέπει να τα καλλιεργήσουμε σε υγρή καλλιέργεια. Εάν η πρωτεΐνη αυτή παράγεται κατά την εκθετική φάση, θα επιλέξουμε μία συνεχή καλλιέργεια, εάν όμως παράγεται κατά τη στατική φάση, θα επιλέξουμε μια κλειστή καλλιέργεια.



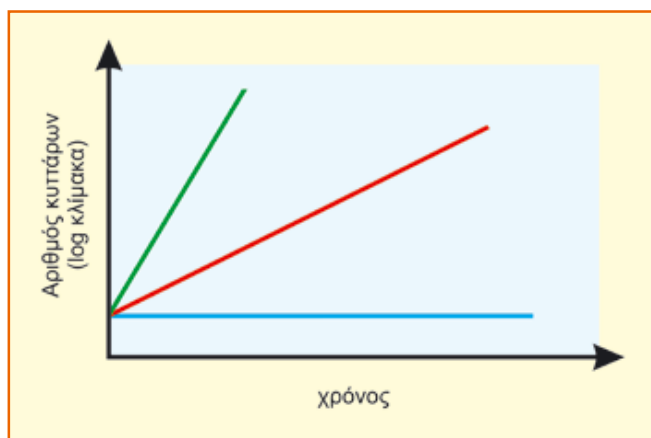
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗΣ



1. Σε κάποιο τρόφιμο βρίσκονται 32 βακτήρια. Αν ο χρόνος διπλασιασμού τους στις συνθήκες συντήρησης του τροφίμου είναι 40 λεπτά, υπολογίστε πόσα βακτήρια θα υπάρχουν στο τρόφιμο μετά από 4 ώρες.
2. Το εμβόλιο μιας υγρής καλλιέργειας ήταν 128 βακτήρια και σε 200 λεπτά ο αριθμός των βακτηρίων δεκαεξαπλασιάστηκε. Κάθε πόσα λεπτά αναπαράγονται τα βακτήρια;
3. Τι ορίζουμε ως Βιοτεχνολογία; Μπορείτε να σκεφτείτε ορισμένα προϊόντα καθημερινής χρήσης, που παράγονται εδώ και αιώνες με μεθόδους Βιοτεχνολογίας;
4. Να συγκρίνετε την κλειστή με τη συνεχή καλλιέργεια.
5. Προσδιορίστε τα χαρακτηριστικά μιας καλλιέργειας που εξαρτώνται από το είδος του μικροοργανισμού.
6. Ποια σειρά βημάτων ακολουθούμε για να καλλιεργήσουμε ένα μικροοργανισμό στο εργαστήριο;
7. Ποιο είναι το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη βακτηριών που ανήκουν στα γένη: *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, και *Clostridium*;
8. Τι εννοούμε όταν λέμε για μια καλλιέργεια μικροοργανισμών;
α. Χρόνος διπλασιασμού.
β. Βιομάζα.
9. Όλοι οι χειρισμοί που γίνονται για την καλλιέργεια ενός είδους μικροοργανισμού απαιτούν συνθήκες ασηψίας. Τι συνέπειες θα μπορούσε να έχει η μόλυνση της καλλιέργειας;
10. Για ποιο λόγο πριν την βιομηχανική κλίμακα μιας καλλιέργειας ενός μικροοργανισμού, προηγείται η εργαστηριακή καλλιέργεια του;
11. Σε μία καλλιέργεια ενός μικροοργανισμού είναι δυνατό να μην παρατηρηθεί λανθάνουσα φάση, όταν πάρουμε εμβόλιο από μια καλλιέργεια και εμβολιάσουμε με αυτό στείρο υγρό θρεπτικό υλικό, στο οποίο επικρατούν οι ίδιες ακριβώς συνθήκες με τη μητρική καλλιέργεια. Πώς ερμηνεύεται αυτό το φαινόμενο;



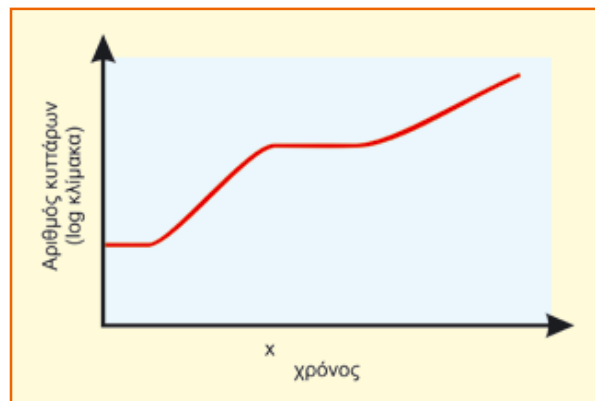
12. Σε ποιο κλάσμα της φυγοκέντρισης αναμένεται να βρίσκεται ένας ενδοκυτταρικός μεταβολίτης που παράγεται από ένα μικροοργανισμό; Τι πρέπει να κάνουμε για τον παραλάβουμε σε καθαρή μορφή;
13. Τα μακροθρεπτικά στοιχεία (αυτά που απαιτούνται συνήθως σε μεγάλες ποσότητες) των περισσότερων μικροοργανισμών, αναφέρονται με τη λέξη CHONPS. Ποιο στοιχείο αντιπροσωπεύει το κάθε γράμμα και γιατί είναι απαραίτητα για τους μικροοργανισμούς;
14. Με βάση το διάγραμμα που φαίνεται παρακάτω, απάντησε στην παρακάτω ερώτηση: Ποια από τις καμπύλες περιγράφει καλύτερα την εκθετική φάση αύξησης ενός θερμοφιλου μικροοργανισμού, που επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου (25°C);



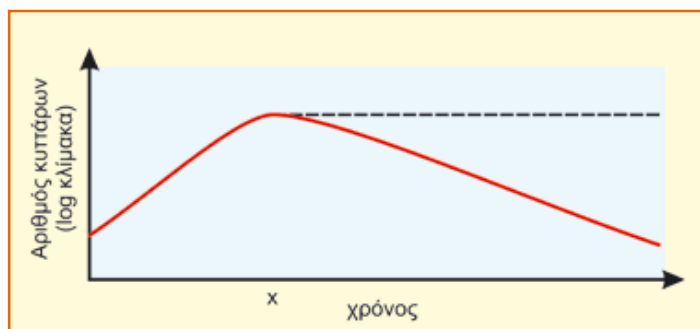
15. Εμβολιάζουμε 100 κύτταρα ενός προαιρετικά αερόβιου μικροοργανισμού πάνω σε στέρεο θρεπτικό υλικό και το επωάζουμε σε αερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια εμβολιάζουμε 100 κύτταρα του ίδιου είδους σε ίδιας σύστασης στέρεο θρεπτικό υλικό και αυτή τη φορά το επωάζουμε αναερόβια. Μετά από επώαση 24 ωρών, θα έχουμε:
- Περισσότερες αποικίες στο τρυβλίο που επώαστηκε αερόβια
 - Περισσότερες αποικίες στο τρυβλίο που επώαστηκε αναερόβια
 - Και τα δύο τρυβλία θα έχουν τον ίδιο αριθμό αποικιών
16. Ποια από τις παρακάτω θερμοκρασίες είναι καταλληλότερη για να θανατώσει ένα μεσόφιλο μικροοργανισμό;
- 50° C
 - 0° C
 - 37° C
 - 60° C



17. Βακτήρια *E. coli* καλλιεργήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες σε θρεπτικό υλικό που περιείχε δύο πηγές άνθρακα (γλυκόζη και λακτόζη). Το διάγραμμα που φαίνεται παρακάτω, παρουσιάζει την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Εξηγήστε τι συνέβη κατά τη χρονική στιγμή x . Ποια από τις δύο πηγές άνθρακα μεταβολίζεται καλύτερα και κατά προτίμηση από τον μικροοργανισμό και γιατί;



18. Η κωνική φιάλη Α περιέχει κύτταρα ζύμης σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα γλυκόζη και επώάζεται στους 30°C, σε αερόβιες συνθήκες. Η φιάλη Β περιέχει την ίδια καλλιέργεια αλλά επώάζεται αναερόβια. Η ζύμη είναι προαιρετικά αερόβια.
α. Ποια καλλιέργεια έχει μικρότερο χρόνο διπλασιασμού;
β. Ποια καλλιέργεια παράγει περισσότερη βιομάζα στον ίδιο χρόνο;
19. Μετά το πλύσιμο των χεριών σας με μια καινούργια πλάκα σαπουνιού, μένουν πάνω στην πλάκα βακτηριακά κύτταρα. Μετά από 24 ώρες που δεν ξαναχρησιμοποιήσατε το σαπούνι αποφασίζεται να ξύσετε την επιφάνεια του σαπουνιού και να τοποθετήσετε τα ξύσματα σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό. Μετά από 24 ώρες επώασης στους 30°C παρατηρήσατε 168 αποικίες βακτηρίων. Πόσα βακτηριακά κύτταρα υπήρχαν πάνω στο σαπούνι; Πώς διατηρήθηκαν πάνω στο σαπούνι;
20. Μια μικροβιακή καλλιέργεια βρίσκετε στην εκθετική φάση όπως φαίνεται στο διάγραμμα παρακάτω. Τη χρονική στιγμή x , ένας αντιμικροβιακός παράγοντας προστίθεται στην καλλιέργεια. Ποια γραμμή παρουσιάζει την πορεία της καλλιέργειας; Γιατί η καμπύλη δεν πέφτει απότομα στο μηδέν;





21. Γιατί η συνεχής καλλιέργεια είναι προτιμότερη από την κλειστή για την παραγωγή ενός μεταβολίτη που παράγεται κατά την εκθετική φάση;
22. Όλες οι ακόλουθες προτάσεις είναι αληθείς για το άγαρ, εκτός από:
- Είναι ένας πολυσακχαρίτης.
 - Προέρχεται από φύκη.
 - Υγροποιείται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 40° C.
23. Υποθέστε ότι θέλετε να καλλιεργήσετε ένα μικροοργανισμό που παράγει αρκετό γαλακτικό οξύ ώστε να μπορεί να τον θανατώσει σε λίγες μέρες.
- Πώς ένας ζυμωτήρας μπορεί να μας βοηθήσει να διατηρήσουμε την καλλιέργεια μας για εβδομάδες ή μήνες;
 - Αν το επιθυμητό προϊόν της καλλιέργειας είναι η βιομάζα, τότε πρέπει να ξεκινήσουμε την συλλογή;
 - Αν το επιθυμητό προϊόν παράγεται κατά τη στατική φάση, έχει νόημα η καλλιέργεια του μικρόβιου σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς καλλιέργειας;
24. Γνωρίζετε ότι ο οίνος είναι προϊόν της αναερόβιας ζύμωσης των σακχάρων που περιέχονται στον χυμό των σταφυλιών (μούστος), από τον ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, ο οποίος καταναλώνει σάκχαρα και παράγει αλκοόλη. Μπορείτε να εξηγήσετε γιατί οι οινοποιοί, αφού τοποθετήσουν το μούστο στα βαρέλια, αφήνουν τα βαρέλια ανοιχτά για μερικές ημέρες;
25. Γνωρίζετε επίσης ότι σε κανένα στάδιο παραγωγής και μεταφοράς του μούστου από το πατητήρι στο βαρέλι, δεν εφαρμόζονται ασηπτικές συνθήκες. Μπορείτε να εξηγήσετε πώς είναι δυνατόν, αφού ο μούστος είναι ένα θρεπτικό υλικό πλούσιο σε σάκχαρα και ιδανικό για την ανάπτυξη πολλών ειδών μικροβίων, μόνο ο *S. cerevisiae* να είναι ο μικροοργανισμός που σε μία επιτυχημένη οινοποίηση, έχει καταναλώσει το συντριπτικά μεγαλύτερο ποσοστό της συγκέντρωσης των σακχάρων του μούστου και να τον έχει μετατρέψει σε οίνο;
26. Ένα στέλεχος βακτηρίων αδυνατεί να βιοσυνθέσει το αμινοξύ φαινυλαλανίνη και για να πολλαπλασιαστεί απαιτεί την παρουσία αυτού του αμινοξέος στο θρεπτικό υλικό του. Μπορείτε να σκεφτείτε πώς αυτά τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση της φαινυλκετονουρίας στα νεογνά;



ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΣΧΟΛΙΚΟΥ ΒΙΒΛΙΟΥ



1. Συμπληρώστε με τις κατάλληλες λέξεις τα κενά:

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το , το , και η Σε μία μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται κατάλληλες συσκευές, οι Προϊόντα της ζύμωσης είναι η ή τα Κατά τη λανθάνουσα φάση ο πληθυσμός των μικροοργανισμών παραμένει Η φάση κατά την οποία ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται με ταχύ ρυθμό ονομάζεται

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το **pH**, το **O₂**, και η **θερμοκρασία**. Σε μία μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται κατάλληλες συσκευές, οι **βιοαντιδραστήρες (ή ζυμωτήρες)**. Προϊόντα της ζύμωσης είναι η **βιομάζα** ή τα **προϊόντα κυττάρων**. Κατά τη λανθάνουσα φάση ο πληθυσμός των μικροοργανισμών παραμένει **σταθερός**. Η φάση κατά την οποία ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται με ταχύ ρυθμό ονομάζεται **εκθετική**.

2. Για την παραλαβή ενός προϊόντος που εκκρίνεται από κύτταρα στρεπτομύκητα ακολουθούνται τα παρακάτω στάδια. Διαγράψτε εκείνα που δεν ισχύουν:

- α. Διαχωρισμός και παραλαβή των κυττάρων του μύκητα.
- β. Διαχωρισμός των υγρών από τα στερεά συστατικά.
- γ. Παραλαβή των υγρών συστατικών.
- δ. Παραλαβή των στερεών συστατικών.
- ε. Καθαρισμός του επιθυμητού προϊόντος.

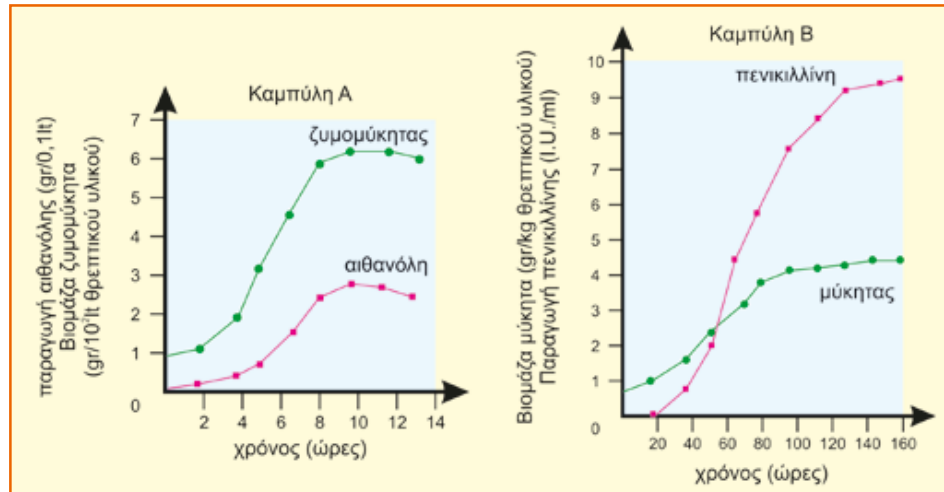
Δεν ισχύουν τα **α** και **δ**. Αφού τα προϊόντα εκκρίνονται έξω από τα κύτταρα.

3. Στις παρακάτω γραφικές παραστάσεις απεικονίζεται η ανάπτυξη δύο μικροοργανισμών του *Saccharomyces* και του *Penicillium*, και η παραγωγή προϊόντων τους, όταν αυτοί καλλιεργηθούν σε βιοαντιδραστήρες. Η καμπύλη Α αφορά την ανάπτυξη του ζυμομύκητα *Saccharomyces* και την παραγωγή αιθανόλης, ενώ η καμπύλη Β την ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium* και την παραγωγή πενικιλίνης.

- α. Εξηγήστε τις αλλαγές στην ανάπτυξη του *Saccharomyces* για τα διαστήματα 0-2, 2-6, 8-10 και 12-14 ώρες.
- β. Εντοπίστε τις φάσεις ανάπτυξης του μύκητα *Saccharomyces* σε σχέση με την παραγωγή αιθανόλης.



γ. Εντοπίστε τις φάσεις ανάπτυξης του μύκητα *Penicillium* σε σχέση με την παραγωγή πενικιλλίνης.

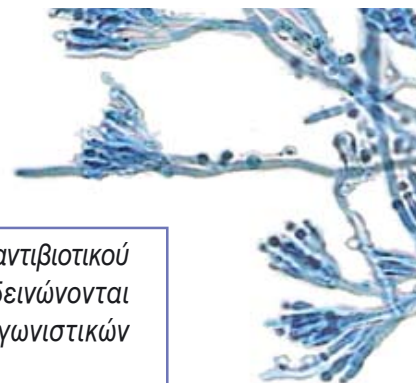


α. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, πρόκειται για κλειστή καλλιέργεια καθώς διακρίνουμε τέσσερις χαρακτηριστικές φάσεις ανάπτυξης: Λανθάνουσα, εκθετική, στατική και φάση θανάτου.

Στο διάστημα 0-2 ώρες, έχουμε τη λανθάνουσα φάση (ο αριθμός των μικροοργανισμών παραμένει σταθερός, μέχρι να προσαρμοστεί στο περιβάλλον), στο διάστημα 2-6 (έως 8) ώρες έχουμε την εκθετική φάση (ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται εκθετικά με το χρόνο), στο διάστημα 8-10 (έως 12) ώρες έχουμε τη στατική φάση (ο αριθμός των μικροοργανισμών παραμένει σταθερός, πιθανή εξάντληση κάποιου θρεπτικού συστατικού ή συσσώρευση αιθανόλης πάνω από το όριο ανθεκτικότητας του ζυμομύκητα), και στο διάστημα 12-14 ώρες έχουμε τη φάση θανάτου (ο αριθμός των μικροοργανισμών συνεχώς μειώνεται, λόγω επιδείνωσης των δυσμενών συνθηκών).

β. Η παραγωγή αιθανόλης ακολουθεί τις φάσεις ανάπτυξης του μύκητα *Saccharomyces*. Η αιθανόλη ξεκινάει να παράγεται με χαμηλό ρυθμό κατά τη λανθάνουσα φάση και ο ρυθμός παραγωγής της μεγιστοποιείται κατά την εκθετική φάση. Η μέγιστη συγκέντρωση της αιθανόλης επιτυγχάνεται στο τέλος της εκθετικής φάσης. Από το μέσο της στατικής φάσης και μετά η συγκέντρωση της παραχθείσας αιθανόλης μειώνεται. Το γεγονός αυτό εξηγείται με δύο τρόπους. Είναι πιθανό με την εξάντληση της πηγής άνθρακα του θρεπτικού υλικού, ο μύκητας εναλλακτικά να μεταβολίζει την αιθανόλη. Ακόμη, είναι πιθανό στην θερμοκρασία της καλλιέργειας (25°C) η αιθανόλη ως ιδιαίτερα πτητική που είναι, να εξατμίζεται.

γ. Η παραγωγή πενικιλλίνης στη λανθάνουσα φάση είναι μηδενική. Στην αρχή της εκθετικής φάσης είναι ελάχιστη, αλλά αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Από το μέσο της εκθετικής φάσης και στη στατική φάση έχουμε μεγάλη αύξηση στην παραγωγή πενικιλλίνης. Η μεγαλύτερη ποσότητα πενικιλλίνης παράγεται κατά τη στατική φάση.



✓ **ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Ο μύκητας *Penicillium*, παράγει αυξημένες ποσότητες του αντιβιοτικού πενικιλλίνη, όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος επιδεινώνονται ώστε να εμποδίσει την πιθανή ανάπτυξη άλλων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών.

4. Ποιες είναι οι συνθήκες που πρέπει να ελέγχονται για την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε βιοαντιδραστήρες; Για ποιο λόγο είναι απαραίτητη η διασφάλιση συνθηκών ασηψίας;

Για την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε βιοαντιδραστήρες πρέπει να ελέγχονται το είδος και η συγκέντρωση των κατάλληλων για κάθε μικροοργανισμό θρεπτικών υλικών, το pH, η συγκέντρωση του O_2 και η θερμοκρασία. Ακόμη, αν πρόκειται για συνεχή καλλιέργεια πρέπει να ελέγχεται ο ρυθμός εισροής φρέσκου θρεπτικού υλικού και ο ρυθμός εκροής της βιομάζας και των προϊόντων της καλλιέργειας. Η διασφάλιση συνθηκών ασηψίας είναι απαραίτητη για να μην αναπτυχθούν ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί.

5. Στον πίνακα Α υπάρχουν τα αποτελέσματα μετρήσεων του αριθμού βακτηρίων από καλλιέργεια μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό στους $30^\circ C$. Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα αυτά κατασκευάστε την καμπύλη μεταβολής του αριθμού των βακτηρίων σε συνάρτηση με το χρόνο. Εξηγήστε τους παράγοντες που επηρεάζουν το σχήμα της καμπύλης.

Χρόνος (ώρες)	Αριθμός βακτηρίων σε εκατομμύρια
0	9
1	10
2	11
5	18
10	400
12	550
15	550
20	550
30	550
35	225
45	30

Η μεταβολή του αριθμού των μικροοργανισμών σε συνάρτηση με τον χρόνο φαίνεται στο διάγραμμα που ακολουθεί.

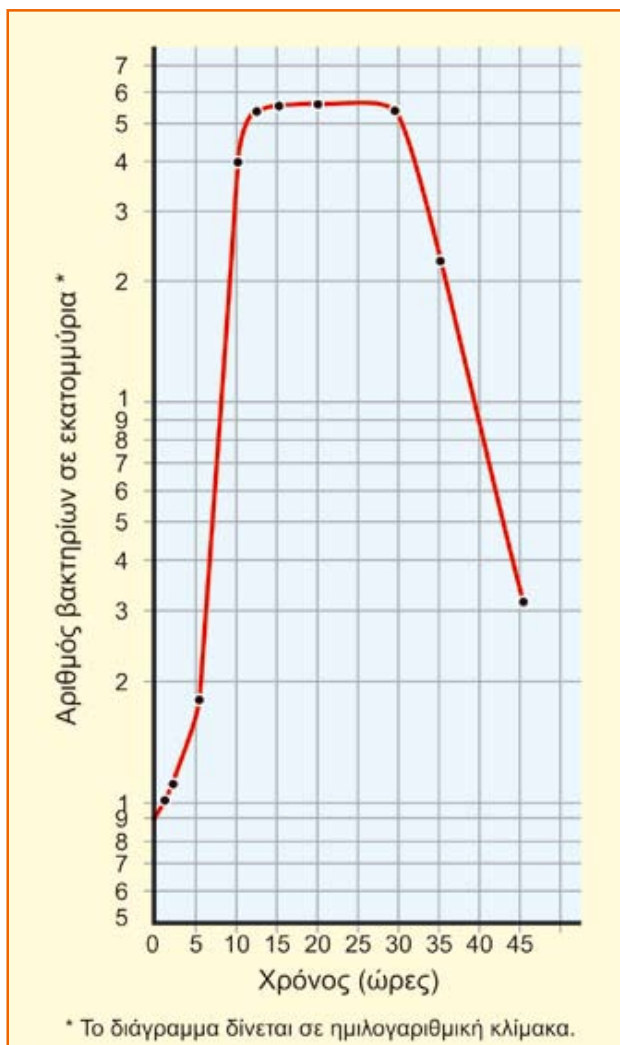
Η μορφή της καμπύλης αντιστοιχεί σε κλειστή καλλιέργεια καθώς διακρίνουμε τις τέσσερις χαρακτηριστικές φάσεις ανάπτυξης: Λανθάνουσα, εκθετική, στατική και φάση θανάτου.

Στην αρχή έχουμε τη λανθάνουσα φάση (0-5 ώρες) κατά την οποία ο πληθυσμός των μικροοργανισμών με τον οποίο εμβολιάσαμε το στείρο θρεπτικό υλικό αυξάνεται με



πολύ αργό ρυθμό. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα, για να προσαρμοστούν στις καινούριες συνθήκες και να αρχίσουν να αναπτύσσονται.

Στη συνέχεια, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών μπαίνει στην εκθετική φάση (5-12 ώρες), κατά την οποία οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με ταχύ ρυθμό, επειδή η καλλιέργεια πραγματοποιείται κάτω από άριστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης O_2 και επειδή στο υλικό της καλλιέργειας υπάρχουν άφθονα θρεπτικά συστατικά. Στην εκθετική φάση ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται ακολουθώντας την γεωμετρική πρόοδο $N_t = N_0 \times 2^n$. Ακολουθεί η στατική φάση (12-30 ώρες), κατά την οποία ο πληθυσμός των βακτηρίων δεν αυξάνεται πλέον, λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή συσσώρευσης τοξικών προϊόντων από το μεταβολισμό των βακτηρίων. Τέλος, έχουμε τη φάση θανάτου (μετά από 30 ώρες) κατά την οποία ο αριθμός των βακτηρίων συνεχώς μειώνεται.





ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ



Οι ασκήσεις που θα συναντήσουμε σε αυτό το κεφάλαιο αφορούν:

- ✓ Στη μεταβολή του πληθυσμού των μικροοργανισμών συναρτήσει του χρόνου της καλλιέργειας.
- ✓ Στη μεταβολή της παραγόμενης ποσότητας ενός μεταβολίτη (προϊόντος) από τον μικροοργανισμό.
- ✓ Στην επιλογή του τύπου της καλλιέργειας των μικροοργανισμών, δηλαδή αν θα είναι κλειστή ή συνεχής, για την παραγωγή ενός μεταβολίτη από τον μικροοργανισμό.
- ✓ Στην ερμηνεία της καμπύλης αύξησης ενός μικροοργανισμού
 - α. όταν αυτή εμφανίζει δύο διαδοχικές εκθετικές φάσεις αύξησης.
 - β. σε δυσμενές περιβάλλον, εξαιτίας της παρουσίας κάποιου τοξικού μεταβολίτη, τοξικής εξωγενούς ουσίας ή περιβαλλοντικών συνθηκών.
 - γ. σε ευνοϊκό περιβάλλον λόγω βελτίωσης των συνθηκών καλλιέργειας.

Οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι, ωστόσο στο κεφάλαιο αυτό οι ασκήσεις αφορούν σχεδόν αποκλειστικά σε μονοκύτταρους μικροοργανισμούς που αναπαράγονται μονογονικά με διχοτόμηση. Έτσι από ένα κύτταρο προκύπτουν δύο, από τα δύο τέσσερα, από τα τέσσερα οκτώ κ.ο.κ. Άρα το πλήθος των κυττάρων που θα έχουμε μετά από n διαιρέσεις ενός αρχικού κυττάρου θα είναι:

$$N_t = 2^n$$

Αν αρχικά δεν έχουμε ένα κύτταρο αλλά περισσότερα, τότε το πλήθος των κυττάρων μετά από n διαιρέσεις θα είναι:

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

Όπου:

N_t = αριθμός κυττάρων τη χρονική στιγμή t , μετά από n διαιρέσεις.

N_0 = αριθμός κυττάρων τη χρονική στιγμή 0, πριν την πρώτη διαίρεση.

n = αριθμός διαιρέσεων.

Βεβαίως η αύξηση αυτή, αφορά μόνο στην εκθετική φάση της καλλιέργειας.

Η μέτρηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους. Η ποιοτική έκφραση του πληθυσμού τους μπορεί να γίνει επίσης με διάφορους τρόπους, όπως π.χ. βάρος βιομάζας/όγκο υγρής καλλιέργειας, αριθμός κυττάρων/όγκο υγρής καλλιέργειας κ.ά. Γι' αυτό το λόγο στις ασκήσεις αυτού του κεφαλαίου συναντάμε στα διαγράμματα, στον άξονα των y , διάφορες μορφές ποιοτικής έκφρασης της βιομάζας ή συχνά για λόγους απλούστευσης αναγράφεται απλώς N .



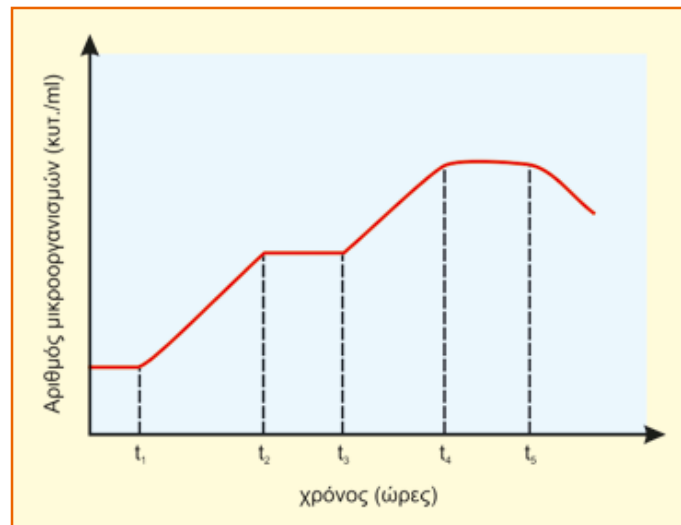
Για να λύσουμε αυτές τις ασκήσεις πρέπει να:

- ✓ Κατασκευάσουμε το γράφημα: **Πλήθος μικρόβιων = $f(t)$** , με βάση τα δεδομένα της άσκησης. Αφού κατασκευάσουμε το γράφημα περιγράφουμε τις διάφορες φάσεις της καλλιέργειας και προσδιορίζουμε το είδος της, αν είναι κλειστή ή συνεχής. Τέλος ερμηνεύουμε την καμπύλη.
- ✓ Κατασκευάσουμε το γράφημα: **Συγκέντρωση μεταβολίτη = $f(t)$** . Συνήθως στο ίδιο διάγραμμα που εμφανίζεται η μεταβολή του πληθυσμού των μικρόβιων, παριστάνεται και η μεταβολή της συγκέντρωσης των παραγόμενων μεταβολιτών τους. Οι μεταβολίτες διακρίνονται σε εξωκυτταρικούς (π.χ. αιθανόλη) και ενδοκυτταρικούς (π.χ. πρωτεΐνες). Οι εξωκυτταρικοί εκκρίνονται έξω από τα κύτταρα και απομονώνονται από το υγρό μέρος της καλλιέργειας. Οι ενδοκυτταρικοί βρίσκονται μέσα στο κύτταρο ή στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και απομονώνονται από τη βιομάζα, μετά τη λύση των μικροβιακών κυττάρων.
- ✓ Παρατηρήσουμε τη γραφική παράσταση της μεταβολής του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε συνάρτηση με τον χρόνο και την καμπύλη που περιγράφει τη μεταβολή της συγκέντρωσης του παραγόμενου μεταβολίτη από τον μικροοργανισμό, επίσης σε συνάρτηση με το χρόνο.

Αν ο μεταβολίτης παράγεται κυρίως στη στατική φάση της καλλιέργειας, τότε επιλέγουμε κλειστή καλλιέργεια, αφού μόνο σε αυτήν η καλλιέργεια φτάνει στη στατική φάση. Αντίθετα αν ο μεταβολίτης παράγεται στην εκθετική φάση της καλλιέργειας, επιλέγουμε τη συνεχή καλλιέργεια των μικροοργανισμών για την παραγωγή του, αφού στη συνεχή καλλιέργεια οι μικροοργανισμοί βρίσκονται συνεχώς σε εκθετική φάση και συνεπώς παράγονται μεγάλες ποσότητες του μεταβολίτη.
- ✓ **a.** Όταν η καμπύλη αύξησης των μικροοργανισμών εμφανίζει δύο διαδοχικές εκθετικές φάσεις (διαύξηση), τότε μπορεί να συμβαίνουν τα εξής, ανάλογα με τα δεδομένα της άσκησης:
 - i.** Ο πληθυσμός μας αυξάνεται σε θρεπτικό υλικό με δύο διαφορετικές πηγές άνθρακα, όπου ο μικροοργανισμός πρώτα καταναλώνει κατά προτίμηση τη μία από τις δύο και όταν αυτή τείνει να εξαντληθεί, μετά από μία νέα φάση προσαρμογής, αρχίζει εκ νέου να αυξάνει καταναλώνοντας τη δεύτερη πηγή άνθρακα. Η ικανότητα καταβολισμού του μικροοργανισμού για κάθε μία από τις δύο διαφορετικές πηγές άνθρακα, φαίνεται από την κλίση της καμπύλης αύξησης κατά την εκθετική φάση. Όσο πιο απότομη είναι η κλίση της καμπύλης στην εκθετική φάση τόσο καλύτερα μεταβολίζεται από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό μία ουσία.
 - ii.** Ο πληθυσμός μας αυξάνεται αρχικά σε θρεπτικό υλικό με μία πηγή άνθρακα, και όταν αυτή τείνει να εξαντληθεί, η καλλιέργεια εισέρχεται σε στατική φάση, οπότε μετά είτε προστίθεται διαφορετική πηγή άνθρακα είτε προστίθεται η ίδια με την αρχική και η καλλιέργεια αρχίζει εκ νέου να αυξάνει.



- iii. Παρατηρείται συσσώρευση ενός τοξικού μεταβολίτη που παράγεται από την καλλιέργεια, όπου πέρα μιας συγκέντρωσης του, η καλλιέργεια εισέρχεται σε στατική φάση. Εάν τότε απομακρυνθεί ο τοξικός μεταβολίτης και το θρεπτικό υλικό δεν έχει καταναλωθεί πλήρως, η καλλιέργεια αρχίζει ξανά να αυξάνει εκθετικά.
- iv. Η καλλιέργεια των μικροοργανισμών αυξάνει σε ορισμένες συνθήκες, οι οποίες αργότερα γίνονται δυσμενέστερες, οπότε η καλλιέργεια εισέρχεται σε στατική φάση και στη συνέχεια, ξαναγίνονται ευνοϊκές για την αύξηση της καλλιέργειας.



- ✓ β. Όταν οι μικροοργανισμοί αυξάνουν σε δυσμενέστερο περιβάλλον από το ιδανικό ή από εκείνο που αναπτύσσονταν προηγουμένως τότε, ανάλογα με την χρονική στιγμή εμφάνισης του δυσμενή παράγοντα, η καλλιέργεια εμφανίζει:
 - i. μεγαλύτερης διάρκειας λανθάνουσα φάση
 - ii. μικρότερο ρυθμό αύξησης κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης
 - iii. ταχεία είσοδο στη φάση θανάτου
 - iv. μεγαλύτερο ρυθμό θανάτου
- ✓ γ. Όταν οι μικροοργανισμοί αυξάνουν σε ευνοϊκότερο περιβάλλον από εκείνο που αναπτυσσόταν προηγουμένως τότε, ανάλογα με τη χρονική στιγμή εμφάνισης του ευνοϊκότερου παράγοντα, η καλλιέργεια εμφανίζει:
 - i. μικρότερης διάρκειας λανθάνουσα φάση
 - ii. μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης
 - iii. μικρότερης διάρκειας στατική φάση που είναι δυνατόν να οδηγήσει και σε εκ νέου εκθετική αύξηση (διαύξηση)
 - iv. μικρότερο ρυθμό θανάτου



ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΙΚΑ ΛΥΜΕΝΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ



1. Εμβολιάζουμε στείρο θρεπτικό υλικό με 10^3 βακτήρια του είδους *Leuconostoc oenos*, τα οποία πολλαπλασιάζονται συνεχώς για οκτώ ώρες, με χρόνο διπλασιασμού σε αυτές τις συνθήκες 30 λεπτά, ενώ η λανθάνουσα φάση διαρκεί δύο ώρες. Μετά την ολοκλήρωση του οκταώρου θανατώνεται το 50% των βακτηρίων και τα υπόλοιπα αφήνονται να πολλαπλασιαστούν σε περιβάλλον που τους επιτρέπει βραδύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού όπου ο χρόνος διπλασιασμού γίνεται διπλάσιος αυτού των προηγούμενων συνθηκών. Ποιος θα είναι ο τελικός πληθυσμός των βακτηρίων δέκα ώρες μετά τη θανάτωση του 50% των βακτηρίων, όταν και πάλι η λανθάνουσα φάση διαρκεί 2 ώρες;

ΛΥΣΗ:

Εφόσον η λανθάνουσα φάση διαρκεί δύο ώρες, η εκθετική φάση της καλλιέργειας θα διαρκεί έξι ώρες. Σε έξι ώρες ή $60 \times 60 = 360$ λεπτά, τα βακτήρια έχουν πραγματοποιήσει $360:30=12$ διαιρέσεις. Επομένως αφού τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται με απλή διχοτόμηση, από ένα κύτταρο προκύπτουν δύο, από τα δύο τέσσερα, από τα τέσσερα οκτώ κ.ο.κ., το πλήθος των κυττάρων που θα υπάρχουν στην καλλιέργεια μετά από 12 διαιρέσεις του εμβολίου, θα είναι:

$$N_t = 10^3 \times 2^{12}$$

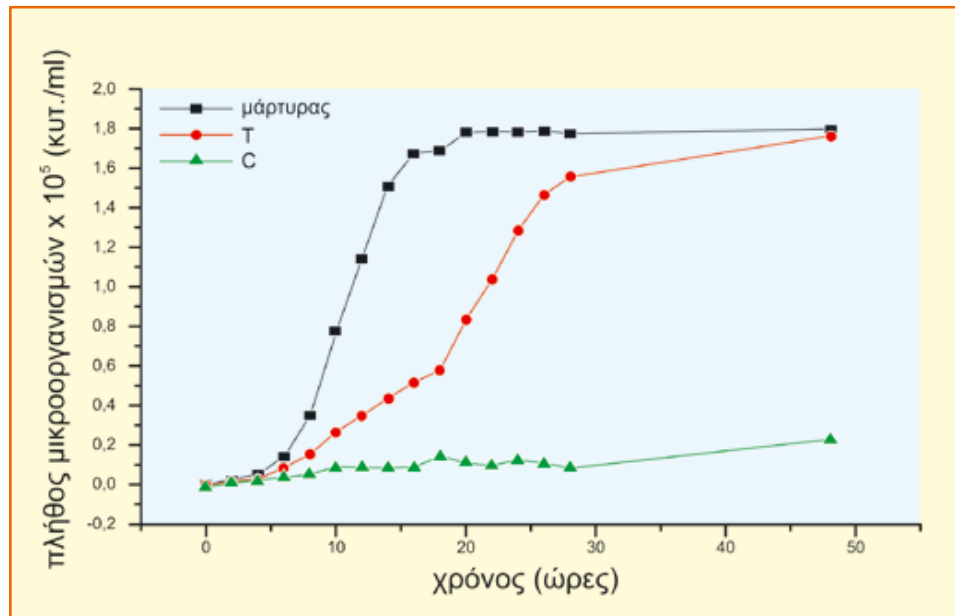
Βεβαίως η αύξηση αυτή, αφορά μόνο στην εκθετική φάση της καλλιέργειας. Μετά τη θανάτωση του 50%, θα επιβιώσουν $(10^3 \times 2^{12}):2$ βακτήρια. Τα βακτήρια αυτά αποτελούν το εμβόλιο της επόμενης καλλιέργειας. Σε οκτώ ώρες που διαρκεί η εκθετική φάση στη δεύτερη καλλιέργεια πραγματοποιούνται οκτώ διαιρέσεις, αφού ο χρόνος διπλασιασμού της καλλιέργειας τώρα, είναι 60 λεπτά. Επομένως μετά από 10 ώρες καλλιέργειας στο δεύτερο θρεπτικό υλικό υπάρχουν:

$$N_t = [(10^3 \times 2^{12}):2] \times 2^8 \text{ βακτήρια.}$$

2. Στο παρακάτω γράφημα, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού μιας κλειστής καλλιέργειας ενός μικροοργανισμού παρουσία δύο χημικών ουσιών των Τ και C. Η μαύρη καμπύλη παρουσιάζει τη μεταβολή του πληθυσμού του μικροοργανισμού όταν αυτός αναπτύσσεται σε ιδανικό περιβάλλον απουσία των Τ και C. Η κόκκινη καμπύλη παρουσιάζει τη μεταβολή της καλλιέργειας, όταν στο θρεπτικό υλικό υπάρχει μία ορισμένη συγκέντρωση της ουσίας Τ. Η πράσινη καμπύλη παρουσιάζει τη μεταβολή της καλλιέργειας, όταν στο θρεπτικό υλικό υπάρχει μια ορισμένη συγκέντρωση της ουσίας C.



Οι συγκεντρώσεις των χημικών ενώσεων Τ και C που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ίδιες. Να ερμηνεύσετε το διάγραμμα.



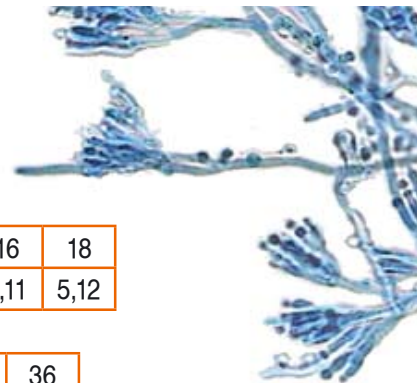
ΛΥΣΗ:

Συγκρίνοντας τις καμπύλες, παρατηρούμε ότι προφανώς οι ουσίες Τ και C, στις συγκεντρώσεις που περιείχονταν στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, παρεμποδίζουν την αύξηση του μικροοργανισμού.

Μάλιστα, η χημική ουσία C, εμφανίζεται πλήρως τοξική για τον μικροοργανισμό σε αυτή τη συγκέντρωση, αφού αυτός μετά από περίπου 50 ώρες καλλιέργειας δεν παρουσίασε καμία αύξηση.

Η χημική ουσία Τ, προφανώς, δρα παρεμποδιστικά στην αύξηση του μικροοργανισμού σε αυτή τη συγκέντρωση, αλλά είναι σαφώς λιγότερο τοξική για αυτόν από τη χημική ουσία C. Παρουσία της χημικής ουσίας Τ στο θρεπτικό υλικό, ο μικροοργανισμός αυξάνει μεν, αλλά με μεγαλύτερο χρόνο διπλασιασμού από ότι στην καλλιέργεια που δεν περιέχει καμία χημική ουσία από τις δύο. Το τελευταίο προκύπτει από το γεγονός ότι, παρουσία της χημικής ουσίας Τ, η καλλιέργεια εμφανίζει μεγαλύτερο χρόνο λανθάνουσας φάσης καθώς και λιγότερο απότομη καμπύλη στην εκθετική φάση από την καμπύλη που περιγράφει την καλλιέργεια χωρίς την παρουσία καμίας χημικής ουσίας από τις δύο στο θρεπτικό υλικό.

- Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τις πειραματικές τιμές της μεταβολής του πληθυσμού του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* συναρτήσει του χρόνου. Να προσδιορίσετε τον τύπο της καλλιέργειας και τη χρονική διάρκεια της κάθε φάσης.

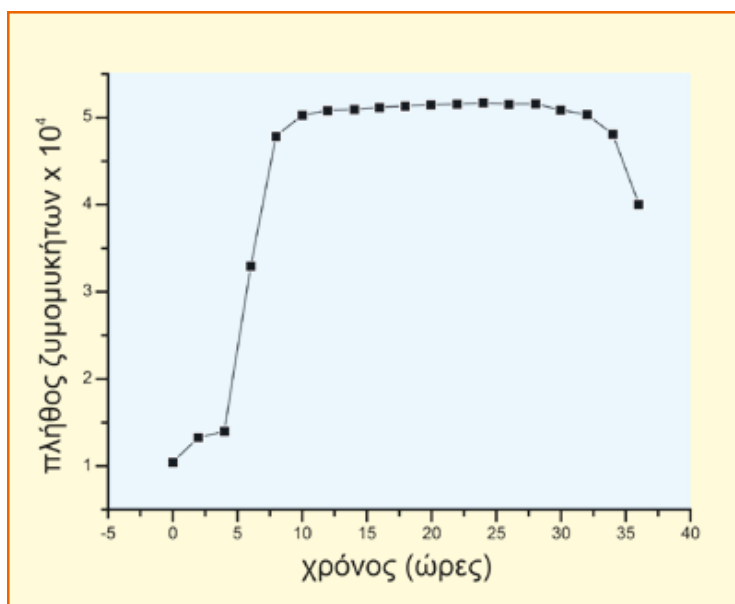


Ώρες	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
ζύμες x 10 ⁴	1,05	1,33	1,40	3,29	4,77	5,02	5,07	5,09	5,11	5,12

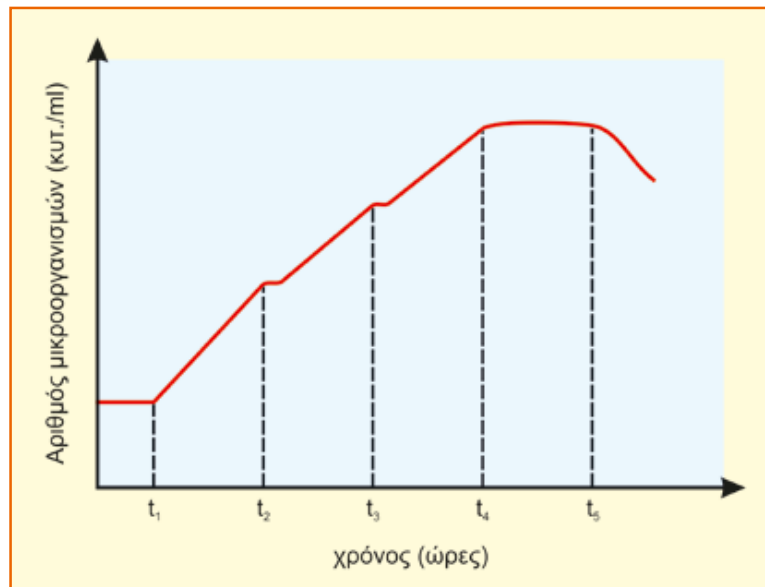
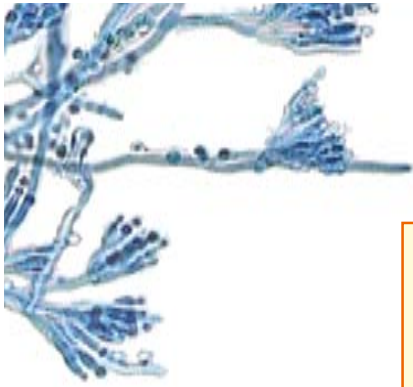
Ώρες	20	22	24	26	28	30	32	34	36
ζύμες x 10 ⁴	5,14	5,15	5,16	5,15	5,15	5,08	5,03	4,80	4,00

ΛΥΣΗ:

Σχεδιάζουμε το γράφημα με βάση τα δεδομένα του πίνακα και παρατηρούμε ότι πρόκειται για κλειστή καλλιέργεια αφού εμφανίζει λανθάνουσα, εκθετική, στατική φάση και φάση θανάτου. Από 0-4 ώρες, η καλλιέργεια βρίσκεται σε λανθάνουσα φάση, 5-9 ώρες βρίσκεται σε εκθετική φάση, 10-28 ώρες σε στατική φάση και 29-36 ώρες σε φάση θανάτου.



4. Μία καλλιέργεια βακτηρίων *E. coli* εκτέθηκε σε ακτινοβολία με αποτέλεσμα να συμβούν μεταλλάξεις. Έστω ότι υπέστησαν μετάλλαξη το οπερόνιο καταβολισμού της λακτόζης και το οπερόνιο βιοσύνθεσης της τρυπτοφάνης. Έτσι προέκυψαν βακτήρια, τα οποία δε διαθέτουν κανένα λειτουργικό οπερόνιο, βακτήρια που δεν είχαν υποστεί μετάλλαξη, και βακτήρια που διαθέτουν λειτουργικό μόνο το ένα από τα δύο οπερόνια, όπου σε άλλα ήταν λειτουργικό αυτό της λακτόζης και σε άλλα εκείνο της τρυπτοφάνης. Εάν τα βακτήρια αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με γλυκόζη και λακτόζη, καθώς και με τέτοια συγκέντρωση τρυπτοφάνης ώστε να αρκεί μέχρι τη χρονική στιγμή t_3 της καλλιέργειας, να ερμηνεύσετε την καμπύλη αύξησης.



ΛΥΣΗ:

Στο νέο θρεπτικό υλικό, που εμβολιάστηκε με τα τέσσερα διαφορετικά στελέχη *E. coli*, μετά τη λανθάνουσα φάση, τα κύτταρα άρχισαν να πολλαπλασιάζονται εκθετικά με το χρόνο καθώς στο θρεπτικό υλικό υπήρχε γλυκόζη και τρυπτοφάνη, οπότε ήταν δυνατόν να αναπτυχθούν ακόμη και τα βακτήρια που δε διέθεταν κανένα λειτουργικό οπερόνιο από τα δύο.

Τη χρονική στιγμή t_2 , όπου η γλυκόζη πλέον εξαντλείται, τα κύτταρα προσπαθούν να προσαρμοστούν στο μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Έτσι, τα κύτταρα που διέθεταν λειτουργικό το οπερόνιο της λακτόζης, ρυθμίζουν την έκφρασή του. Όμως τα κύτταρα που δε διαθέταν λειτουργικό οπερόνιο λακτόζης θανατώνονται καθώς δεν μπορούν να καταβολίσουν την λακτόζη και να προσλάβουν ενέργεια και άνθρακα.

Τα κύτταρα όμως που διαθέτουν λειτουργικό το οπερόνιο της λακτόζης, μετά την έκφρασή του, άρχισαν να καταβολίζουν λακτόζη και να πολλαπλασιάζονται εκθετικά με το χρόνο.

Αυτό συμβαίνει μέχρι τη χρονική στιγμή t_3 , όπου εξαντλείται το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Εδώ τα κύτταρα θα πρέπει να ρυθμίσουν την έκφραση του οπερόνιου βιοσύνθεσης της τρυπτοφάνης από ανόργανα μόρια. Τα βακτήρια όμως που είχαν υποστεί μετάλλαξη λόγω της ακτινοβολίας, στο οπερόνιο της τρυπτοφάνης, αδυνατούν να το εκφράσουν και πεθαίνουν. Έτσι, τα μόνα κύτταρα που συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται μέχρι εξαντλήσεως της λακτόζης είναι αυτά που διέθεταν λειτουργικά και τα δύο οπερόνια.

Όταν η λακτόζη εξαντληθεί (χρονική στιγμή t_4), η καλλιέργεια εισέρχεται σε στατική φάση και κατόπιν σε φάση θανάτου (χρονική στιγμή t_5).

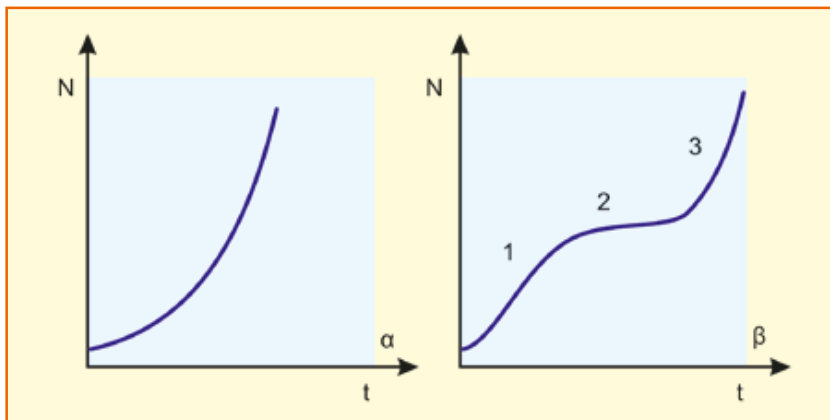


ΑΣΚΗΣΕΙΣ - ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΛΥΣΗ

1. Έστω ένα βακτήριο που διπλασιάζεται κάτω από ιδανικές συνθήκες κάθε 60 λεπτά. Ποιος θα είναι ο αριθμός των βακτηρίων και ποια η μάζα τους μετά από 24 ώρες; Θεωρούμε ότι το βακτήριο έχει μορφή σφαίρας με διάμετρο 1 χιλιοστό του μέτρου και ότι η πυκνότητα του είναι διπλάσια από την πυκνότητα του νερού.

Δίνεται ότι ο όγκος σφαίρας υπολογίζεται από τον τύπο: $\frac{4}{3} \pi r^3$ (r =ακτίνα), και η πυκνότητα του νερού είναι 1 gr/cm^3 .

2. Ποιες είναι οι συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων στα πιο κάτω διαγράμματα, όπως αυτές καθορίζονται από τις καμπύλες. Μπορούμε να εξαγάγουμε ασφαλές συμπέρασμα για το αν η καλλιέργεια που περιγράφει κάθε διάγραμμα είναι κλειστή ή συνεχής;



3. Γνωρίζετε την γραφική παράσταση που περιγράφει την ανάπτυξη των μονοκύτταρων μικροοργανισμών σε κλειστή καλλιέργεια. Ποια αναμένεται ότι θα είναι η μορφή της, όσον αφορά την εκθετική αύξηση, όταν οι μικροοργανισμοί αναπτυχθούν σε περιβάλλον με την ίδια συγκέντρωση πηγής C, αλλά:
- α. με ευνοϊκότερες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και συγκέντρωσης οξυγόνου;
 - β. σε δυσμενέστερες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και συγκέντρωσης οξυγόνου;
- Ποια αναμένεται ότι θα είναι η μορφή της, όταν οι μικροοργανισμοί αναπτυχθούν σε περιβάλλον με τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης οξυγόνου, και σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει:
- γ. μεγαλύτερη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών;
 - δ. μικρότερη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών;

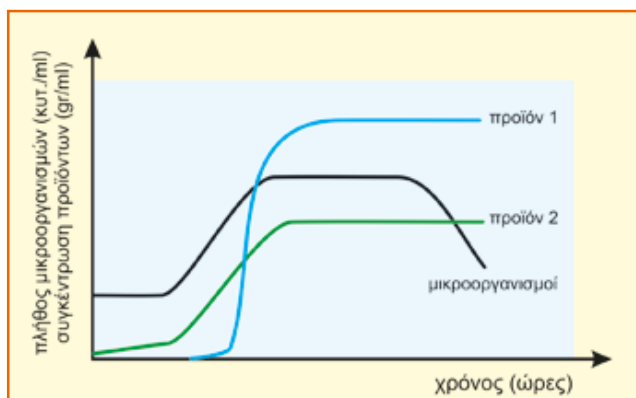


4. Σχεδιάστε την καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε συνεχή καλλιέργεια. Ποιες φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών παρατηρούνται και γιατί;
5. Η ζύμη *Candida boidinii* αναπτύσσεται σε μεθανόλη, με αρχική συγκέντρωση 10gr/lt. Σε βιοαντιδραστήρα όπου πραγματοποιείται κλειστή καλλιέργεια της ζυμής αυτής, ελήφθησαν οι παρακάτω μετρήσεις:

ΧΡΟΝΟΣ (ώρες)	ΒΙΟΜΑΖΑ (gr/lt)	ΜΕΘΑΝΟΛΗ (gr/lt)
0	2,0	60
2	2,1	59,4
4	3,1	57
8	10	49
10	19	42
12	32	30
14	55	6
16	61	0,6
18	62	0

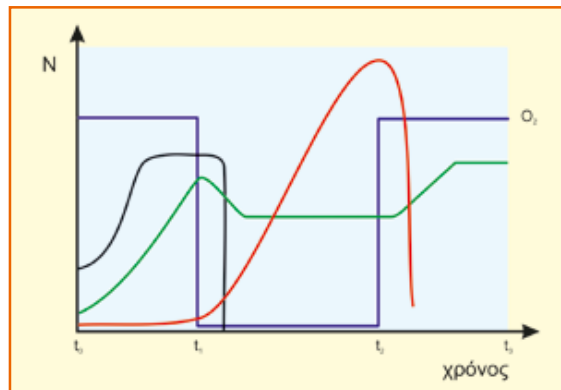
Να δημιουργηθεί διάγραμμα στο οποίο να εμφανίζονται μαζί οι καμπύλες:
βιομάζα = f (χρόνος) και μεθανόλη = f (χρόνος). Τι παρατηρείτε;

6. Ξέρουμε ότι στη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών, ο αριθμός τους παραμένει σχεδόν σταθερός, λόγω προσπάθειας προσαρμογής τους στο νέο περιβάλλον. Τι συμβαίνει λοιπόν στα μικροβιακά κύτταρα κατά τη φάση αυτή σε μοριακό επίπεδο;
7. Στο διάγραμμα που φαίνεται παρακάτω, παριστάνεται η μεταβολή του αριθμού των μικροοργανισμών σε μια καλλιέργεια σε συνδυασμό με την ποσότητα παραγωγής των προϊόντων 1 (βιοτίνη) και 2 (γαλακτικό οξύ). Από τη μορφή της καμπύλης, τι συμπέρασμα βγαίνει ως προς το είδος της καλλιέργειας; Ποιο είδος καλλιέργειας ευνοεί την παραγωγή της βιοτίνης και ποιο του γαλακτικού οξέος;



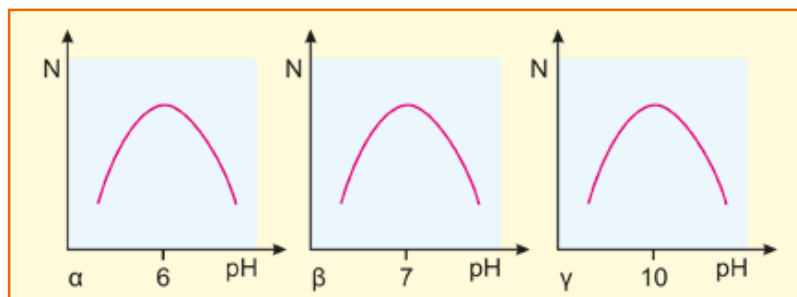


8. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η μεταβολή του πλήθους τριών διαφορετικών μικροοργανισμών, των *Pseudomonas* sp., *Saccharomyces cerevisiae* και *Clostridium* sp., σε συνάρτηση με τη μεταβολή της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Σε τι κατηγορία ανήκει ο κάθε μικροοργανισμός ως προς την απαίτησή του σε οξυγόνο; Ποιά καμπύλη περιγράφει την αύξηση καθενός από τους τρεις μικροοργανισμούς;

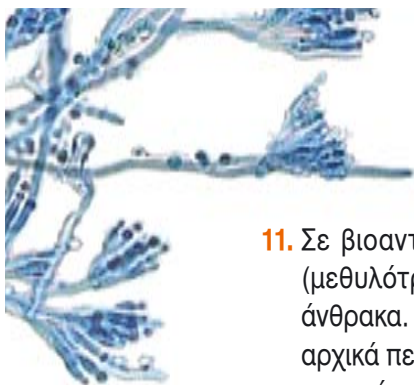


Σχεδιάστε τις αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης των τριών μικροοργανισμών όταν η καμπύλη της συγκέντρωσης του O_2 είναι ακριβώς η αντίθετη. Δηλαδή $t_0 \rightarrow t_1$ ελάχιστη, $t_1 \rightarrow t_2$ μέγιστη, $t_2 \rightarrow t_3$ ελάχιστη.

9. Ποιο διάγραμμα περιγράφει το ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου *Bacillus alcalophilus* σε συνάρτηση με το pH του θρεπτικού υλικού;

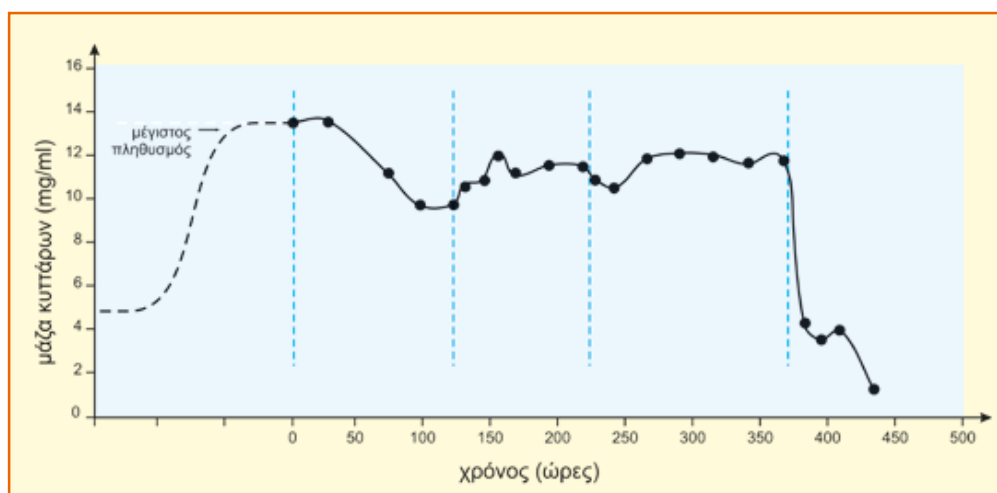


10. Ο βακτηριοφάγος λ μπορεί να ακολουθήσει λυσιγόνο κύκλο ζωής, όπου μετά την μόλυνση του βακτηρίου ενθέτει το γονιδιώμα του σε εκείνο του βακτηρίου οπότε αντιγράφεται καθώς το βακτήριο αντιγράφει το DNA του και διπλασιάζεται. Έτσι προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα που φέρουν το DNA του ιού. Κάτω από ορισμένες συνθήκες το DNA του ιού, μπορεί να ενεργοποιηθεί και αφού σχηματιστούν νέοι ιοί, να λύσουν τα βακτηριακά κύτταρα και να μολύνουν τα υγιή γειτονικά. Στο εργαστήριο αναπτύσσονται δύο κλειστές καλλιέργειες του βακτηρίου *E. coli*. Η πρώτη αναπτύσσεται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει λακτόζη και γλυκόζη και η άλλη σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μόνο γλυκόζη. Όμως η δεύτερη καλλιέργεια μολύνθηκε από τον λ-φάγο που ακολουθεί λυσιγόνο κύκλο ζωής. Να σχεδιαστούν τα διαγράμματα $N_{\text{βακτηρίων}} = f(t)$ και $N_{\text{ιόν}} = f(t)$ των δύο καλλιεργειών και να δοθεί η ερμηνεία τους.



11. Σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας, καλλιεργείται μια μεθυλότροφη ζύμη (μεθυλότροφη = χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα οργανικές ενώσεις με ένα άτομο άνθρακα. Π.χ. μεθανόλη, φορμαλδεΐδη κ.ά.). Το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας αρχικά περιείχε μεθανόλη ως αποκλειστική πηγή άνθρακα μέχρι που οι ζύμες έφτασαν στον μέγιστο πληθυσμό για τον όγκο του ζυμωτήρα. Τότε στο θρεπτικό υλικό προστίθονταν αυξανόμενες συγκεντρώσεις φορμαλδεΐδης σε τακτά διαστήματα.

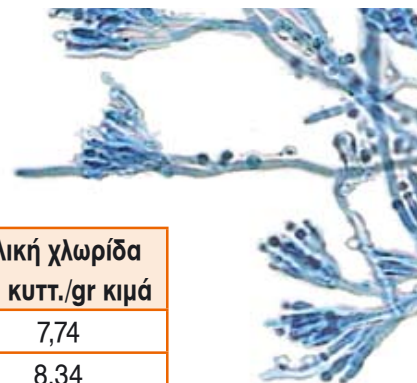
Στο παρακάτω διάγραμμα, η συγκέντρωση της φορμαλδεΐδης στο θρεπτικό μέσο είναι 20ml/l τις πρώτες 110 ώρες λειτουργίας του ζυμωτήρα, στη συνέχεια η συγκέντρωση της αυξάνει σε 30ml/l για τις επόμενες 110 ώρες και τέλος η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα γίνεται 40ml/l για τις επόμενες 150 ώρες. Μετά από 370 ώρες συνεχούς καλλιέργειας της ζύμης στον βιοαντιδραστήρα, η συγκέντρωση της φορμαλδεΐδης στο θρεπτικό μέσο αυξάνεται σε 45ml/l από 40ml/l, όποτε και η καλλιέργεια πεθαίνει μετά από 70 περίπου ώρες. Σχολιάστε τις μεταβολές στον πληθυσμό των κυττάρων της ζύμης λόγω των αυξανόμενων συγκεντρώσεων φορμαλδεΐδης στο θρεπτικό μέσο.



12. Σε ένα πραγματικό πείραμα μελετήθηκε η αλλοίωση του κιμά από βόειο κρέας, ο οποίος συντηρήθηκε στους 5°C και στους 8°C, στον ατμοσφαιρικό αέρα (αερόβιες συνθήκες). Τα αποτελέσματα που πήραμε ήταν τα εξής:

α.α. μέτρησης	<i>B. thermosphacta</i> log κυττ./gr κιμά	<i>Pseudomonas</i> sp. log κυττ./gr κιμά	<i>Lactobacillus</i> sp. log κυττ./gr κιμά	Ολική χλωρίδα log κυττ./gr κιμά
1	6,69	7,00	6,30	7,69
2	6,69	7,00	6,30	7,69
3	7,34	7,54	6,90	8,69
4	7,56	8,54	7,39	9,69
5	9,09	10	8	11

Μετρήσεις σε κιμά που φυλάσσονταν αερόβια, σε θερμοκρασία 5°C.



α.α. μέτρησης	<i>B. thermosphacta</i> log κυττ./gr κιμά	<i>Pseudomonas</i> sp. log κυττ./gr κιμά	<i>Lactobacillus</i> sp. log κυττ./gr κιμά	Ολική χλωρίδα log κυττ./gr κιμά
1	4,34	4,64	6,47	7,74
2	6,94	7,31	6,77	8,34
3	7,65	7,90	7,04	8,68
4	7,90	9,23	7,69	9,34
5	8,01	9,17	7,95	9,40

Μετρήσεις σε κιμά που φυλάσσονταν αερόβια σε θερμοκρασία 8°C.

Πραγματοποιούνταν καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλία με το κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό για το κάθε είδος μικροοργανισμού. Η καταμέτρηση γίνονταν μετά την 48^η ώρα επώασης των τρυβλίων στους 25°C, ώστε να έχουν αυξηθεί ικανοποιητικά οι αποικίες. Πραγματοποιήθηκαν 5 μετρήσεις για κάθε τρυβλίο. Όλα τα τρυβλία είχαν επιστρωθεί με 0,1 ml εμβολίου από υγρές καλλιέργειες των μικροοργανισμών.

Στους παραπάνω πίνακες δίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που πάρθηκαν.

Να γίνουν οι γραφικές παραστάσεις με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και να σχολιαστούν. Μπορείτε να βρείτε τον ρόλο των τριών μικροοργανισμών στην αλλοίωση του κιμά στις παραπάνω συνθήκες;

13. Σε ένα πείραμα μετρήθηκε η τοξική επίδραση δύο νέων χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων του Α και του Β, εναντίον ενός βακτηρίου που προσβάλλει τις μηλιές (*Malus domestica*). Στο *in vitro* πείραμα, μετρήθηκε η αύξηση της ίδιας ποσότητας εμβολίου του βακτηρίου σε τρεις διαφορετικές υγρές καλλιέργειες. Στην πρώτη το θρεπτικό υλικό δεν περιείχε κανένα τοξικό παράγοντα, στη δεύτερη περιείχε την τοξική ουσία Α και στην τρίτη την τοξική ουσία Β. Λαμβάνονταν μετρήσεις του πληθυσμού στις καλλιέργειες κάθε δύο ώρες και τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω πίνακα.

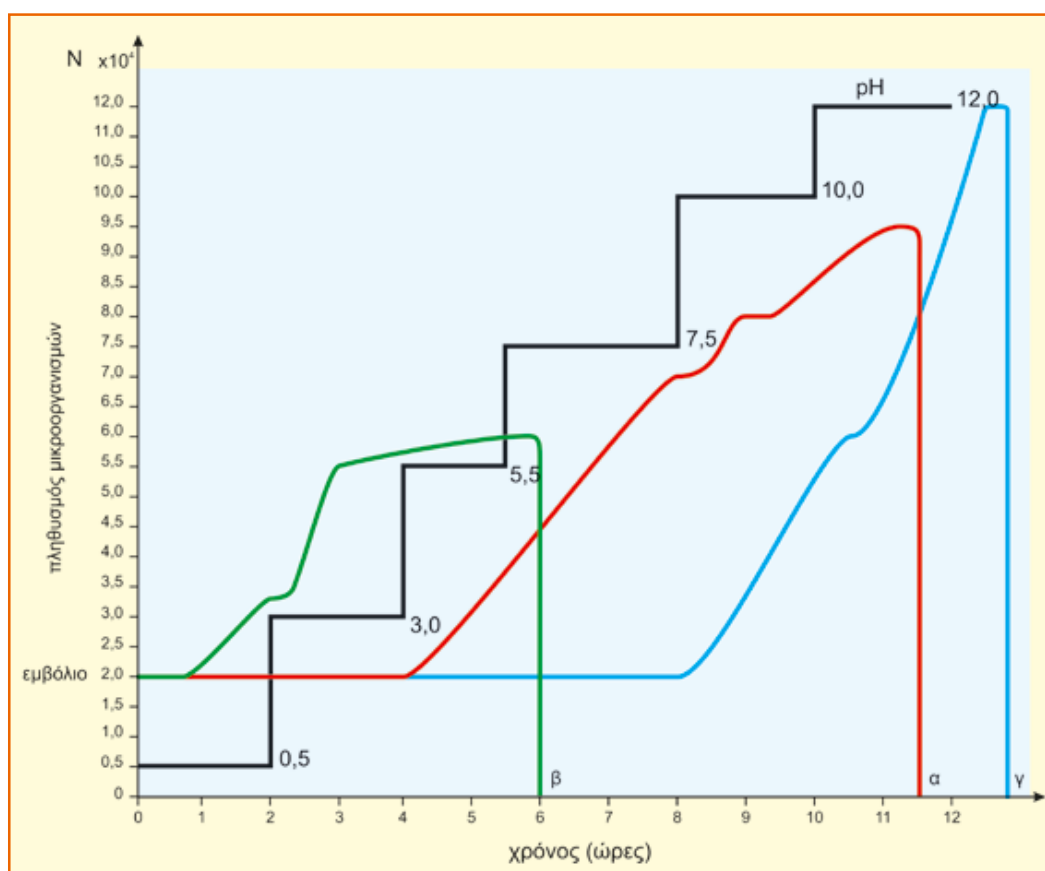
χρόνος μέτρησης	χωρίς τοξική ουσία log κυττ./gr καλλιέργειας	τοξική ουσία Α log κυττ./gr καλλιέργειας	τοξική ουσία Β log κυττ./gr καλλιέργειας
0	0,29	0,29	0,29
2	0,30	0,30	0,30
4	0,31	0,30	0,30
6	0,45	0,32	0,31
8	0,65	0,36	0,32
10	0,74	0,40	0,34
12	0,81	0,48	0,36
14	0,89	0,50	0,38
16	0,90	0,53	0,42
18	0,90	0,52	0,41



χρόνος μέτρησης	χωρίς τοξική ουσία log κυττ./gr καλλιέργειας	τοξική ουσία Α log κυττ./gr καλλιέργειας	τοξική ουσία Β log κυττ./gr καλλιέργειας
20	0,91	0,54	0,42
22	0,88	0,53	0,40
24	0,80	0,42	0,33
26	0,72	0,38	0,32
28	0,64	0,33	0,30

Ποιο από τα δύο φυτοπροστατευτικά προϊόντα θα προτείνετε για την προστασία του μηλεώνα από τα συγκεκριμένα βακτήρια και γιατί;

14. Το παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζει την μεταβολή του πληθυσμού τριών διαφορετικών μικροοργανισμών, των *Staphylococcus aureus*, *Thiobacillus thiooxidans* και *Bacillus alcalophilus* (α, β, γ), οι οποίοι έχουν εντελώς διαφορετικές απαιτήσεις στο pH του περιβάλλοντος όπου αναπτύσσονται. Μπορείται να προσδιορίσετε το ελάχιστο, το άριστο και το μέγιστο της τιμής του pH για τον καθένα από τους τρεις μικροοργανισμούς;





ΔΙΑΓΩΝΙΣΜΑ



Ζήτημα 1ο

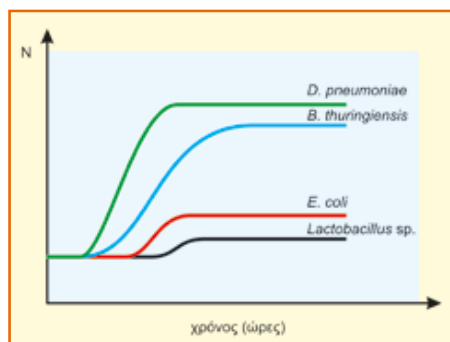
A. Να σημειώσετε τη σωστή απάντηση.

1. Ζύμωση ονομάζεται:

- α. Κάθε διαδικασία αερόβιας ή αναερόβιας αναπνοής.
- β. Κάθε διαδικασία ανάπτυξης μικροοργανισμών σε στερεό θρεπτικό μέσο.
- γ. Κάθε διαδικασία ανάπτυξης μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό μέσο.
- δ. Κάθε διαδικασία παρασκευής ζύμης.

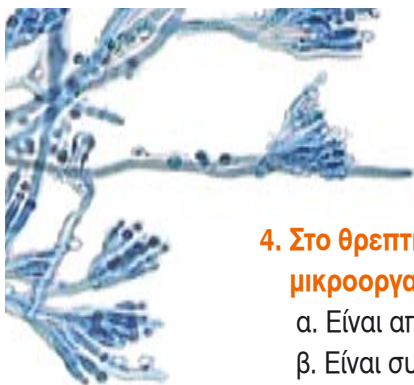
2. Στο γράφημα παριστάνονται οι καμπύλες ανάπτυξης τεσσάρων διαφορετικών ειδών βακτηρίων σε δεδομένες συνθήκες. Κατατάξτε τα τέσσερα είδη, από το καλύτερα προσαρμοσμένο προς το χειρότερα προσαρμοσμένο:

- α. *Lactobacillus* sp., *E. coli*, *B. thuringiensis*, *D. pneumoniae*.
- β. *D. pneumoniae*, *B. thuringiensis*, *E. coli*, *Lactobacillus* sp..
- γ. *E. coli*, *D. pneumoniae*, *Lactobacillus* sp., *B. thuringiensis*.
- δ. *Lactobacillus* sp., *D. pneumoniae*, *B. thuringiensis*, *E. coli*.



3. Σε ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας, ένας ζυμομύκητας έχει χρόνο διπλασιασμού 120 λεπτά. Αν το εμβόλιο της καλλιέργειας ήταν 2×10^4 κύτταρα, πόσα κύτταρα θα υπάρχουν στην καλλιέργεια μετά από 20 ώρες;

- α. $2 \times 10^4 \times 2^{10}$.
- β. 4^{10} .
- γ. 2×2^{14} .
- δ. 2×10^{14} .



4. Στο θρεπτικό υλικό μιας καλλιέργειας, είναι απαραίτητο να υπάρχουν για όλους τους μικροοργανισμούς μεταλλικά ιόντα, διότι:

- α. Είναι απαραίτητα για τη δράση των ενζύμων.
- β. Είναι συστατικά των νουκλεοτιδίων.
- γ. Είναι πηγή ενέργειας.
- δ. Είναι μακροστοιχεία.
- ε. Τα α και β.
- στ. Τα α, β και δ.

5. Τι θα συμβεί στην εκθετική φάση της καμπύλης ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού, αν αυξήσουμε τη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών;

- α. Ο χρόνος διπλασιασμού τους θα αυξηθεί.
- β. Ο ρυθμός ανάπτυξης τους θα αυξηθεί.
- γ. Ο ρυθμός ανάπτυξης τους θα παραμείνει σταθερός.
- δ. Ο χρόνος διπλασιασμού τους θα μειωθεί.

(Μόρια 15)

B. Να χαρακτηρίσετε με σωστό (Σ) ή λάθος (Λ) τις παρακάτω προτάσεις και να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

Σ Λ

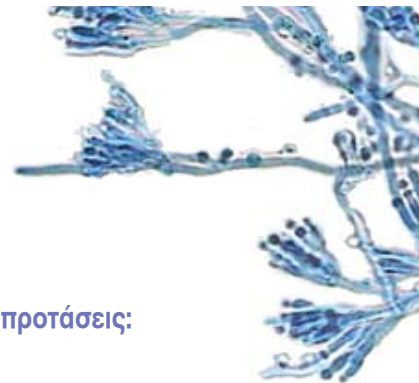
A. Ο βιοτεχνολόγος που είναι υπεύθυνος για τη βιομηχανική παραγωγή των γαλακτοβακίλλων, που χρησιμοποιούνται από τις γαλακτοβιομηχανίες για την παρασκευή γιαούρτης, προτού εμβολιάσει τον ζυμωτήρα των 50.000 τόνων, είχε πραγματοποιήσει προκαταρκτικές εργαστηριακές καλλιέργειες και καλλιέργειες μεσαίας κλίμακας.

☐ ☐

B. Στη συνεχή καλλιέργεια οι μικροοργανισμοί βρίσκονται συνεχώς σε ανάπτυξη, δηλαδή το πλήθος των κύτταρων της καλλιέργειας αυξάνει εκθετικά με τον χρόνο. Όλα τα κύτταρα αυτού του συνεχώς αυξανόμενου πληθυσμού, διατηρούνται σε ζυμωτήρα συγκεκριμένων διαστάσεων, μέχρι το τέλος της καλλιέργειας.

☐ ☐

(Μόρια 10)



Ζήτημα 2ο

A. Να συμπληρώσετε με τους κατάλληλους όρους τα κενά στις παρακάτω προτάσεις:

- A. Οι μικροοργανισμοί παράγουν χρήσιμα προϊόντα κατά τη διάρκεια της και της ανάπτυξης τους σε μια καλλιέργεια.
- B. Η Βιοτεχνολογία συνδυάζει και, χρησιμοποιώντας ζωντανούς οργανισμούς για την παραγωγή προϊόντων.
- Γ. Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών αυξάνεται με τη μείωση του
- Δ. Οι ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται άριστα σε θερμοκρασία°C και οι θερμόφιλοι σε θερμοκρασία°C.
- E. Το περιβάλλον ανάπτυξης των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* είναι ενώ το περιβάλλον ανάπτυξης των βακτηρίων του γένους *Mycobacterium* είναι οπωσδήποτε

(Μόρια 10)

B. Να περιγράψετε τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η παραγωγή και η παραλαβή των προϊόντων μιας μικροβιακής καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα.

(Μόρια 15)

Ζήτημα 3ο

A. Να σχεδιάσετε την καμπύλη που περιγράφει την ανάπτυξη του ετερότροφου μικροοργανισμού *E. coli*. που αναπτύσσεται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει από την αρχή ως πηγές άνθρακα λακτόζη και γλυκόζη. Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

(Μόρια 10)

B. Εργάζεστε ως βιοτεχνολόγος για λογαριασμό μιας φαρμακοβιομηχανίας. Σας ανατίθεται η εμπορική παραγωγή ενός μικροβιακού προϊόντος, σημαντικού για τη διατροφή του ανθρώπου. Γνωρίζετε ότι το βακτήριο *Xanthomonas* sp. παράγει σε μεγάλες ποσότητες, ενδοκυτταρικά, τον συγκεκριμένο μεταβολίτη καθώς διαθέτει οπερόνιο που ελέγχει την βιοσύνθεση του. Ωστόσο το βακτήριο αυτό σε ιδανικές συνθήκες έχει πολύ μεγάλο χρόνο διπλασιασμού, τουλάχιστον 6-πλάσιο του *E.coli*. και ακόμη απαιτεί για την ανάπτυξη του ένα ιδιαίτερο θρεπτικό υλικό. Το βακτήριο *E.coli* δεν παράγει αυτόν τον μεταβολίτη.

Σχεδιάστε τα βήματα που θα ακολουθήσετε προκειμένου να παράγει η βιομηχανία το επιθυμητό προϊόν.

(Μόρια 15)



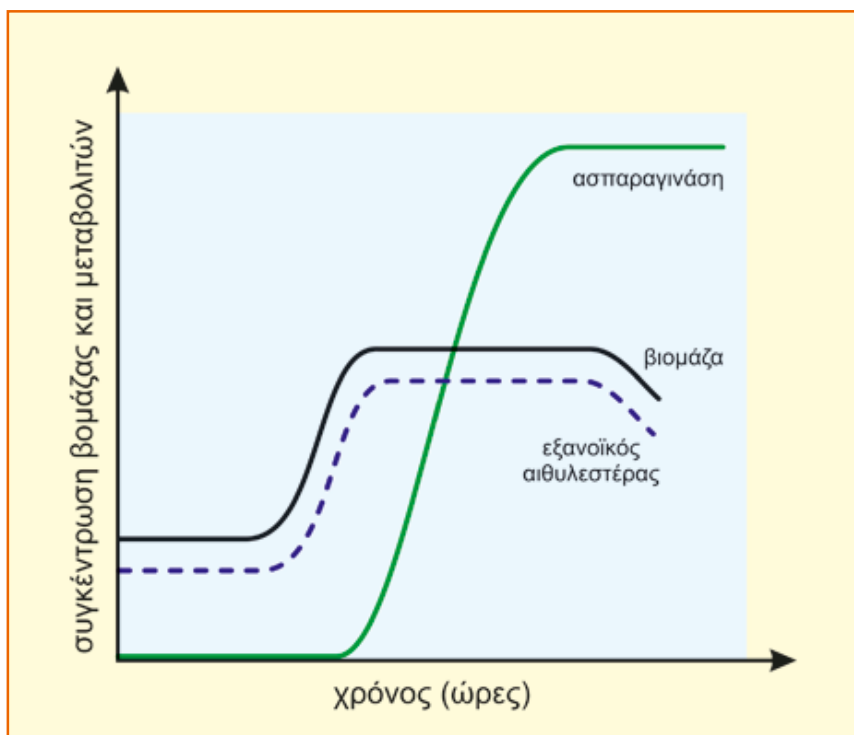
Ζήτημα 4ο

Ένα μικροοργανισμός χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο για τους εξής λόγους: Για τον εξανοϊκό αιθυλεστέρα που παράγει εξωκυτταρικά, για την πρωτεΐνη ασπαραγινάση που παράγει ενδοκυτταρικά και για την βιομάζα του, που χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής πλούσιο σε πρωτεΐνες.

Στην παρακάτω γραφική παράσταση, φαίνονται οι μεταβολές στην ποσότητα των παραπάνω προϊόντων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του.

Τι είδους καλλιέργεια είναι; Η κλειστή ή η συνεχής καλλιέργεια θα είναι καταλληλότερη για τα προϊόντα που δίνει ο μικροοργανισμός αυτός; Μπορούμε να έχουμε ενός μόνο τύπου καλλιέργεια για όλα τα προϊόντα;

Με ποιους τρόπους θα παραλάβουμε τα παραπάνω προϊόντα από την καλλιέργεια;



(Μόρια 25)