Κεφάλαιο 7

Αρχές και μεθοδολογία της Βιοτεχνολογίας

Πώς καλλιεργούμε μικροοργανισμούς στο εργαστήριο και στη βιομηχανία: τα θρεπτικά υλικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη, η κλειστή και η συνεχής καλλιέργεια, οι φάσεις ανάπτυξης και τα βήματα για την παραγωγή ενός προϊόντος.

1 Βασικοί όροι
2 Τι είναι η Βιοτεχνολογία
3 Θρεπτικά υλικά
4 Παράγοντες ανάπτυξης
5 Ζύμωση και φάσεις
6 Βιομηχανική καλλιέργεια
7 Στοιχεία μικροβιολογίας
8 Υπολογισμοί
9 Συγκρίσεις
10 Αυτοέλεγχος

1 Βασικοί όροι

Οι ορισμοί αυτού του κεφαλαίου ζητούνται συχνά αυτούσιοι. Μάθε τους σε ζευγάρια: κλειστή και συνεχής καλλιέργεια, εμβολιασμός και μόλυνση, αυτότροφοι και ετερότροφοι μικροοργανισμοί, λανθάνουσα και στατική φάση.

Άγαρ — Πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη. Χρησιμοποιείται για την παρασκευή στερεών θρεπτικών υλικών. Είναι ρευστό σε θερμοκρασίες πάνω από 45 °C και στερεοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Αποικία — Το σύνολο των μικροοργανισμών που έχουν προκύψει από τις διαδοχικές διαιρέσεις ενός αρχικού κυττάρου πάνω σε στερεό θρεπτικό υλικό. Είναι ορατή με γυμνό οφθαλμό.

Απομόνωση — Οι διαδικασίες που οδηγούν στο να ξεχωρίσει ένας μικροοργανισμός από τους υπόλοιπους που ζουν στο φυσικό περιβάλλον του.

Αποστείρωση — Η καταστροφή όλων των μικροοργανισμών που υπάρχουν στα θρεπτικά υλικά και στις συσκευές, πριν αρχίσει η καλλιέργεια. Έτσι αναπτύσσεται μόνο ο μικροοργανισμός που μας ενδιαφέρει.

Αυτότροφοι μικροοργανισμοί	Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα το CO_2.
Βιοαντιδραστήρας	Συσκευή μέσα στην οποία γίνεται καλλιέργεια μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα (βιομηχανική καλλιέργεια). Επιτρέπει τον έλεγχο και τη ρύθμιση των συνθηκών της καλλιέργειας: θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση O_2. Ονομάζεται και ζυμωτήρας.
Βιομάζα	Τα κύτταρα (π.χ. βακτήρια) που υπάρχουν μέσα στον βιοαντιδραστήρα.
Βιοτεχνολογία	Η χρήση ζωντανών οργανισμών προς όφελος του ανθρώπου. Αποτελεί συνδυασμό επιστήμης και τεχνολογίας, με στόχο την εφαρμογή των γνώσεων που έχουν αποκτηθεί από τη μελέτη των ζωντανών οργανισμών.
Εκθετική φάση	Η φάση της καλλιέργειας κατά την οποία οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με ταχύ ρυθμό, γιατί οι συνθήκες είναι άριστες και τα θρεπτικά συστατικά άφθονα.
Εμβολιασμός	Η τεχνητή προσθήκη μικροοργανισμών σε ένα νέο περιβάλλον, όπως ένας δοκιμαστικός σωλήνας, ένα θρεπτικό υλικό ή ένας βιοαντιδραστήρας.
Ετερότροφοι μικροοργανισμοί	Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα οργανικές ενώσεις, κυρίως υδατάνθρακες.
Ζύμωση	Η διαδικασία ανάπτυξης μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες. Παλαιότερα ο όρος αφορούσε μόνο τις αναερόβιες διεργασίες.
Θρεπτικό υλικό	Το μέσο, υγρό ή στερεό, που περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται ένας μικροοργανισμός για να αναπτυχθεί.
Κλειστή καλλιέργεια	Τύπος ζύμωσης κατά τον οποίο στον βιοαντιδραστήρα τοποθετείται ορισμένη ποσότητα αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού, η οποία στη συνέχεια εμβολιάζεται με αρχική καλλιέργεια μικροοργανισμών. Εμφανίζει τέσσερις φάσεις ανάπτυξης: λανθάνουσα, εκθετική, στατική και φάση θανάτου.

Λανθάνουσα φάση	Η πρώτη φάση της καλλιέργειας. Ο πληθυσμός παραμένει σχεδόν σταθερός, γιατί οι μικροοργανισμοί χρειάζονται χρόνο για να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες.
Μόλυνση	Η είσοδος παθογόνων μικροοργανισμών σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον: το ανθρώπινο σώμα, έναν άλλο οργανισμό, έναν χώρο (π.χ. ένα εργαστήριο) ή έναν βιοαντιδραστήρα.
Προαιρετικά αερόβιοι μικροοργανισμοί	Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται και χωρίς O_2, αλλά με ταχύτερο ρυθμό όταν υπάρχει, π.χ. οι μύκητες της αρτοβιομηχανίας.
Στατική φάση	Η φάση της κλειστής καλλιέργειας κατά την οποία ο πληθυσμός δεν αυξάνεται, επειδή έχει εξαντληθεί κάποιο θρεπτικό συστατικό ή έχουν συσσωρευτεί τοξικά προϊόντα του μεταβολισμού.
Συνεχής καλλιέργεια	Τύπος ζύμωσης κατά τον οποίο οι μικροοργανισμοί τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικά συστατικά, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται κύτταρα (νεκρά βακτήρια) και άχρηστα προϊόντα (τοξίνες). Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται διαρκώς σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
Τελική κατεργασία	Το σύνολο των διαδικασιών με τις οποίες, μετά το τέλος της ζύμωσης, το προϊόν διαχωρίζεται, απομονώνεται και καθαρίζεται, ώστε να είναι κατάλληλο για χρήση.
Υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί	Μικροοργανισμοί που για να αναπτυχθούν χρειάζονται υψηλή συγκέντρωση O_2, π.χ. τα βακτήρια του γένους *Mycobacterium*.
Υποχρεωτικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί	Μικροοργανισμοί για τους οποίους το O_2 είναι τοξικό, π.χ. τα βακτήρια του γένους *Clostridium*.
Φάση θανάτου	Η τελευταία φάση της κλειστής καλλιέργειας, κατά την οποία ο αριθμός των μικροοργανισμών μειώνεται.
Χρόνος διπλασιασμού	Ο χρόνος που χρειάζεται για να διπλασιαστεί ο αριθμός των κυττάρων ενός πληθυσμού μικροοργανισμών. Με αυτόν εκφράζεται ο ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού.

2 Τι είναι η Βιοτεχνολογία

Βιοτεχνολογία είναι η χρήση ζωντανών οργανισμών προς όφελος του ανθρώπου. Συνδυάζει επιστήμη και τεχνολογία, με στόχο να εφαρμοστούν οι γνώσεις που έχουμε αποκτήσει από τη μελέτη των ζωντανών οργανισμών.

Δεν είναι καινούργια επιστήμη

Με την ευρεία έννοια του όρου, η Βιοτεχνολογία είναι πολύ παλιά. Ο άνθρωπος χρησιμοποιεί μικροοργανισμούς εδώ και χιλιάδες χρόνια, πολύ πριν μάθει ότι υπάρχουν. Αυτό που άλλαξε τις τελευταίες δεκαετίες είναι ότι μπορούμε να τροποποιούμε το γενετικό υλικό των οργανισμών, ώστε να παράγουν ουσίες που δεν θα παρήγαν ποτέ μόνοι τους.

Αρχαιότητα

Ψωμί, κρασί, γιαούρτι

Παρασκευή ψωμιού, κρασιού, μπίρας, γιαουρτιού και τυριού με τη βοήθεια μικροοργανισμών, χωρίς να είναι γνωστός ο ρόλος τους.

19ος αιώνας

Pasteur

Δείχνει ότι οι ζυμώσεις οφείλονται στη δράση μικροοργανισμών.

1928

Fleming

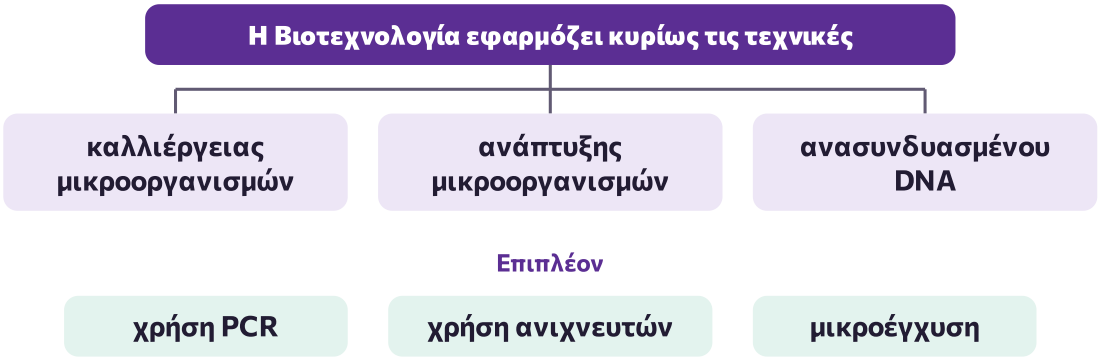
Παρατηρεί ότι ο μύκητας *Penicillium* παράγει μια ουσία που εμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων, την πενικιλίνη. Η παραγωγή της σε μεγάλη κλίμακα ξεκινά τη δεκαετία του 1940.

Δεκαετία του 1970

Ανασυνδυασμένο DNA

Μικροοργανισμοί τροποποιούνται ώστε να παράγουν ανθρώπινες πρωτεΐνες, όπως η ινσουλίνη.

Σε ποιες τεχνικές στηρίζεται



Οι καλλιέργειες μικροοργανισμών είναι το αντικείμενο αυτού του κεφαλαίου. Το ανασυνδυασμένο DNA, η PCR και οι ανιχνευτές είναι γνωστά από το Κεφάλαιο 4.

Τομείς εφαρμογής

Υγεία
φαρμακευτικές πρωτεΐνες (ινσουλίνη, ιντερφερόνες, αυξητική ορμόνη), εμβόλια, αντιβιοτικά, μονοκλωνικά αντισώματα, γονιδιακή θεραπεία (Κεφάλαιο 8)

Γεωργία και κτηνοτροφία
διαγονιδιακά φυτά και ζώα με βελτιωμένες ιδιότητες (Κεφάλαιο 9)

Τρόφιμα
ψωμί, γαλακτοκομικά προϊόντα, αλκοολούχα ποτά

Περιβάλλον
μικροοργανισμοί που αποικοδομούν ρύπους και καθαρίζουν απόβλητα

---

3 Θρεπτικά υλικά και καλλιέργεια στο εργαστήριο

Στο φυσικό τους περιβάλλον οι μικροοργανισμοί βρίσκουν μόνοι τους ό,τι χρειάζονται. Για να αναπτυχθούν στο εργαστήριο, πρέπει να τους τα δώσουμε εμείς, μέσα σε ένα **θρεπτικό υλικό**.

Απαραίτητα θρεπτικά συστατικά

Πηγή άνθρακα
CO_2 για τους αυτότροφους μικροοργανισμούς, υδατάνθρακες για τους ετερότροφους. Στη βιομηχανία χρησιμοποιείται συχνά η μελάσα, παραπροϊόν της βιομηχανίας ζάχαρης

Πηγή αζώτου
αμμωνιακά ή νιτρικά ιόντα

Μεταλλικά ιόντα
απαραίτητα για τις χημικές αντιδράσεις του κυττάρου και ως συστατικά διάφορων μορίων

Νερό
μέσα σε αυτό είναι διαλυμένα όλα τα υπόλοιπα συστατικά

Υγρά και στερεά θρεπτικά υλικά

Υγρό θρεπτικό υλικό
τα θρεπτικά συστατικά διαλυμένα σε νερό. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται διασκορπισμένοι σε όλο τον όγκο του

Στερεό θρεπτικό υλικό
υγρό θρεπτικό υλικό στο οποίο έχει προστεθεί άγαρ. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται στην επιφάνειά του και σχηματίζουν αποικίες

Το **άγαρ** είναι πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη. Είναι ρευστό σε θερμοκρασίες πάνω από 45 °C και στερεοποιείται σε χαμηλότερες. Έτσι το θρεπτικό υλικό χύνεται ζεστό στο τρυβλίο και πήζει καθώς κρυώνει.

> **Προσοχή**
> Το άγαρ **δεν είναι θρεπτικό συστατικό**. Δεν αποτελεί πηγή άνθρακα για τους μικροοργανισμούς, απλώς στερεοποιεί το θρεπτικό υλικό.

Αποστείρωση και εμβολιασμός

Αποστείρωση
πριν αρχίσει η καλλιέργεια, καταστρέφονται όλοι οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στα θρεπτικά υλικά και στις συσκευές

Εμβολιασμός
στο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό προστίθεται μικρή ποσότητα από τον μικροοργανισμό που θέλουμε να καλλιεργήσουμε

Εμβολιασμός και μόλυνση

Και στις δύο περιπτώσεις μπαίνουν μικροοργανισμοί σε ένα νέο περιβάλλον. Ο εμβολιασμός όμως είναι **σκόπιμος**, ενώ η μόλυνση είναι η ανεπιθύμητη είσοδος παθογόνων μικροοργανισμών.

Καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό

Σε στερεό θρεπτικό υλικό κάθε κύτταρο μένει στη θέση του και οι απόγονοί του μαζεύονται γύρω του. Γι' αυτό η μέθοδος χρησιμεύει για την απομόνωση μικροοργανισμών.

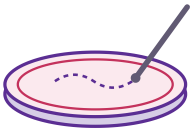
1



Διάλυμα βακτηρίων

Ξεκινάμε από ένα διάλυμα βακτηριακών κυττάρων.

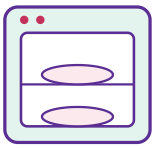
2



Άπλωμα σε τρυβλίο

Το διάλυμα απλώνεται σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό άγαρ. Τα μεμονωμένα κύτταρα δεν φαίνονται με γυμνό οφθαλμό.

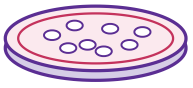
3



Επώαση

Το τρυβλίο μένει σε κλίβανο για 12 έως 76 ώρες.

4



Αποικίες

Εμφανίζονται ορατές αποικίες. Κάθε μία έχει προκύψει από ένα αρχικό κύτταρο.

4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη

Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών εκφράζεται με τον **χρόνο διπλασιασμού**: τον χρόνο που χρειάζεται για να διπλασιαστεί ο αριθμός των κυττάρων. Όσο μικρότερος είναι, τόσο γρηγορότερα αναπτύσσεται ο πληθυσμός. Η E. coli, σε άριστες συνθήκες, διπλασιάζεται περίπου κάθε 20 λεπτά.

Ο χρόνος διπλασιασμού εξαρτάται από τέσσερις παράγοντες: τα **θρεπτικά συστατικά**, το **pH**, το **οξυγόνο** και τη **θερμοκρασία**.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης

Παράγοντας	Τι ισχύει για τους περισσότερους	Εξαιρέσεις και παραδείγματα
Θρεπτικά συστατικά	Πρέπει να υπάρχουν πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου, μεταλλικά ιόντα και νερό.	Αυτότροφοι: CO_2. Ετερότροφοι: υδατάνθρακες.
pH	Αναπτύσσονται σε pH 6–9.	Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* αναπτύσσονται σε pH 4–5.
Θερμοκρασία	Αναπτύσσονται άριστα στους 20–45 °C. Η *E. coli* στους 37 °C.	Βακτήρια των θερμών πηγών: πάνω από 45 °C. Άλλα είδη: κάτω από 20 °C.
Οξυγόνο	Η ανάγκη για O_2 διαφέρει από είδος σε είδος.	Τρεις κατηγορίες, που φαίνονται παρακάτω.

Οι μικροοργανισμοί και το οξυγόνο

Υποχρεωτικά αερόβιοι
χρειάζονται υψηλή συγκέντρωση O_2 για να αναπτυχθούν, π.χ. τα βακτήρια του γένους *Mycobacterium*

Προαιρετικά αερόβιοι
αναπτύσσονται και χωρίς O_2, αλλά ταχύτερα όταν υπάρχει, π.χ. οι μύκητες της αρτοβιομηχανίας

Υποχρεωτικά αναερόβιοι
το O_2 είναι τοξικό γι' αυτούς, π.χ. τα βακτήρια του γένους *Clostridium*

Μικροοργανισμοί που πρέπει να θυμάσαι

Escherichia coli	Άριστη θερμοκρασία 37 °C. Σε άριστες συνθήκες διπλασιάζεται περίπου κάθε 20 λεπτά.
Lactobacillus	Αναπτύσσεται σε όξινο περιβάλλον, pH 4–5.
Mycobacterium	Υποχρεωτικά αερόβιος.

Clostridium	Υποχρεωτικά αναερόβιος.
Μύκητες της αρτοβιομηχανίας	Προαιρετικά αερόβιοι.
Βακτήρια θερμών πηγών	Άριστη θερμοκρασία πάνω από 45 °C.
Penicillium	Μύκητας που παράγει το αντιβιοτικό πενικιλίνη.

Κόλπο για τις ασκήσεις

Κοίτα τι κάνει ο πληθυσμός όταν αλλάζει το οξυγόνο. Αν αρχίζει να αναπτύσσεται μόλις έρθει σε επαφή με τον αέρα, είναι υποχρεωτικά αερόβιος. Αν μειώνεται, είναι υποχρεωτικά αναερόβιος. Αν απλώς αναπτύσσεται γρηγορότερα, είναι προαιρετικά αερόβιος.

5 Ζύμωση, κλειστή και συνεχής καλλιέργεια

Ζύμωση ονομάζουμε τη διαδικασία ανάπτυξης μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό, κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες. Παλαιότερα ο όρος αφορούσε μόνο τις αναερόβιες διεργασίες. Σήμερα καλύπτει και τις αερόβιες.

Προϊόντα της ζύμωσης

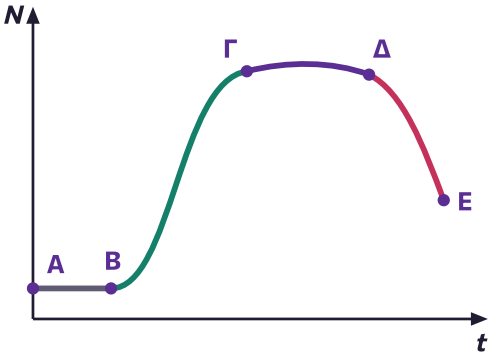
Η βιομάζα
τα ίδια τα κύτταρα που προκύπτουν

Τα προϊόντα των κυττάρων
π.χ. πρωτεΐνες και αντιβιοτικά

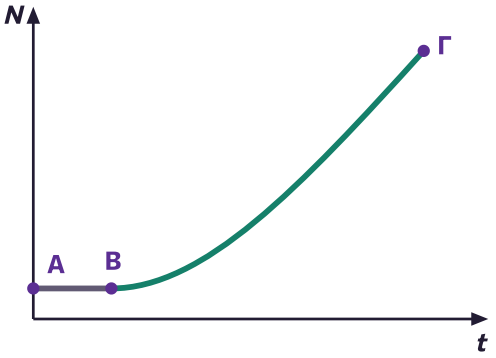
Δύο τύποι ζύμωσης

Κλειστή καλλιέργεια
στον βιοαντιδραστήρα τοποθετείται ορισμένη ποσότητα αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού, που εμβολιάζεται με αρχική καλλιέργεια μικροοργανισμών. Από εκεί και πέρα δεν προστίθεται και δεν αφαιρείται τίποτα

Συνεχής καλλιέργεια
οι μικροοργανισμοί τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικά συστατικά, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται νεκρά κύτταρα και άχρηστα προϊόντα



Κλειστή καλλιέργεια. ΑΒ λανθάνουσα, ΒΓ εκθετική, ΓΔ στατική, ΔΕ φάση θανάτου.



Συνεχής καλλιέργεια. ΑΒ λανθάνουσα, ΒΓ εκθετική.

Ν: αριθμός μικροοργανισμών. t: χρόνος.

Οι φάσεις ανάπτυξης

Λανθάνουσα φάση

Ο πληθυσμός παραμένει σχεδόν σταθερός. Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες και να αρχίσουν να αναπτύσσονται.

Εκθετική φάση

Οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με ταχύ ρυθμό, γιατί οι συνθήκες (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση O_2) είναι άριστες και τα θρεπτικά συστατικά άφθονα.

Στατική φάση

Ο πληθυσμός δεν αυξάνεται, είτε επειδή εξαντλήθηκε κάποιο θρεπτικό συστατικό είτε επειδή συσσωρεύτηκαν τοξικά προϊόντα του μεταβολισμού.

Φάση θανάτου

Ο αριθμός των μικροοργανισμών μειώνεται.

Στη συνεχή καλλιέργεια τα θρεπτικά συστατικά δεν εξαντλούνται και τα τοξικά προϊόντα δεν συσσωρεύονται. Γι' αυτό οι μικροοργανισμοί βρίσκονται **διαρκώς σε εκθετική φάση** και δεν περνούν ποτέ σε στατική φάση ή φάση θανάτου.

> **Προσοχή**
> Στη λανθάνουσα και στη στατική φάση ο πληθυσμός είναι σταθερός, για διαφορετικό όμως λόγο. Στη λανθάνουσα οι μικροοργανισμοί **προσαρμόζονται**. Στη στατική έχουν **εξαντληθεί θρεπτικά συστατικά** ή έχουν **συσσωρευτεί τοξικά προϊόντα**.

Πώς διαβάζω μια καμπύλη ανάπτυξης

Τι βλέπω	Τι σημαίνει
Οριζόντιο τμήμα στην αρχή	Λανθάνουσα φάση.
Απότομη άνοδος	Εκθετική φάση. Όσο πιο απότομη η κλίση, τόσο μικρότερος ο χρόνος διπλασιασμού.
Οριζόντιο τμήμα μετά από άνοδο	Στατική φάση.
Σταδιακή πτώση στο τέλος	Φάση θανάτου.
Απότομη πτώση στη μέση	Άλλαξαν ξαφνικά οι συνθήκες: πολύ υψηλή θερμοκρασία, ακατάλληλο pH ή είσοδος O_2 σε καλλιέργεια υποχρεωτικά αναερόβιου μικροοργανισμού.
Νέα άνοδος μετά από πτώση	Οι συνθήκες αποκαταστάθηκαν και τα κύτταρα που επέζησαν διαιρούνται ξανά, εφόσον υπάρχουν ακόμη θρεπτικά συστατικά.
Μηδενική ανάπτυξη και μετά άνοδος	Έλειπε ένας απαραίτητος παράγοντας, π.χ. το O_2 για έναν υποχρεωτικά αερόβιο μικροοργανισμό.
Άνοδος με μικρή κλίση	Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται, αλλά όχι στις άριστες συνθήκες του.

6 Βιομηχανική καλλιέργεια

Η καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα γίνεται μέσα σε **βιοαντιδραστήρες** (ζυμωτήρες). Εκεί ελέγχονται και ρυθμίζονται συνεχώς η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση του O_2. Πριν φτάσει όμως ο μικροοργανισμός στον βιοαντιδραστήρα, περνά από το εργαστήριο.

Τα βήματα για την παραγωγή ενός προϊόντος

1. **Αποστείρωση** των υλικών.

2. **Επιλογή και απομόνωση** του κατάλληλου μικροοργανισμού. Για την παραγωγή ανθρώπινων πρωτεϊνών ο μικροοργανισμός τροποποιείται με μεθόδους γενετικής μηχανικής.
3. **Εμβολιασμός** σε θρεπτικό υλικό και διαμόρφωση των κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης (εργαστηριακή καλλιέργεια).
4. **Επώαση** των μικροοργανισμών σε κλίβανο για 12 έως 76 ώρες (καλλιέργεια μεσαίας κλίμακας).
5. **Αδρανοποίηση** των μικροοργανισμών σε κατάψυξη, στους −80 °C.
6. **Εμβολιασμός** μέρους των μικροοργανισμών στο υγρό θρεπτικό υλικό του βιοαντιδραστήρα. Ακολουθεί κλειστή ή συνεχής καλλιέργεια, ανάλογα με το επιθυμητό προϊόν (βιομηχανική καλλιέργεια).
7. **Διαχωρισμός**, με διήθηση ή φυγοκέντρηση, των στερεών από τα υγρά συστατικά του βιοαντιδραστήρα.
8. **Απομόνωση και καθαρισμός** του προϊόντος με ειδική μέθοδο, είτε από τα στερεά είτε από τα υγρά συστατικά.
9. **Συσκευασία, αποθήκευση και διανομή** του προϊόντος.

Τελική κατεργασία

Οταν ολοκληρωθεί η ζύμωση, το περιεχόμενο του βιοαντιδραστήρα είναι μείγμα από στερεά και υγρά συστατικά. Τα βήματα 7 και 8 αποτελούν την **τελική κατεργασία**: το προϊόν πρέπει να παραληφθεί καθαρό.

Στερεά συστατικά
τα κύτταρα, δηλαδή η βιομάζα. Εδώ αναζητείται το προϊόν όταν είναι η ίδια η βιομάζα ή μια ουσία που μένει μέσα στα κύτταρα

Υγρά συστατικά
το θρεπτικό υλικό με όσα έχουν εκκρίνει οι μικροοργανισμοί. Εδώ αναζητείται το προϊόν όταν εκκρίνεται από τα κύτταρα

Ποιος τύπος καλλιέργειας για ποιο προϊόν
Ένα προϊόν που συντίθεται στη **στατική φάση** παράγεται μόνο με **κλειστή καλλιέργεια**, γιατί στη συνεχή τα κύτταρα δεν φτάνουν ποτέ στη στατική φάση. Ένα προϊόν που συντίθεται στην **εκθετική φάση** συμφέρει να παραχθεί με **συνεχή καλλιέργεια**.

Προσοχή

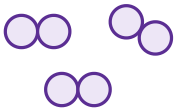
Στην κλειστή καλλιέργεια τα χρήσιμα προϊόντα παράγονται συνήθως στην εκθετική και στη στατική φάση. Στη συνεχή παράγονται στην εκθετική φάση.

---

7 Στοιχεία μικροβιολογίας

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που καλλιεργούνται στη Βιοτεχνολογία είναι βακτήρια. Διακρίνονται με βάση το σχήμα τους.

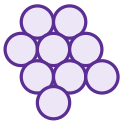
Σχήματα βακτηρίων



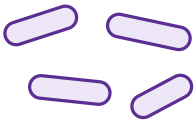
Διπλόκοκκοι
σφαιρικά, ανά δύο



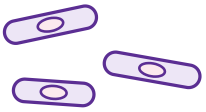
Στρεπτόκοκκοι
σφαιρικά, σε αλυσίδα



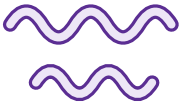
Σταφυλόκοκκοι
σφαιρικά, σαν τσαμπί



Βάκιλοι
ραβδόμορφα

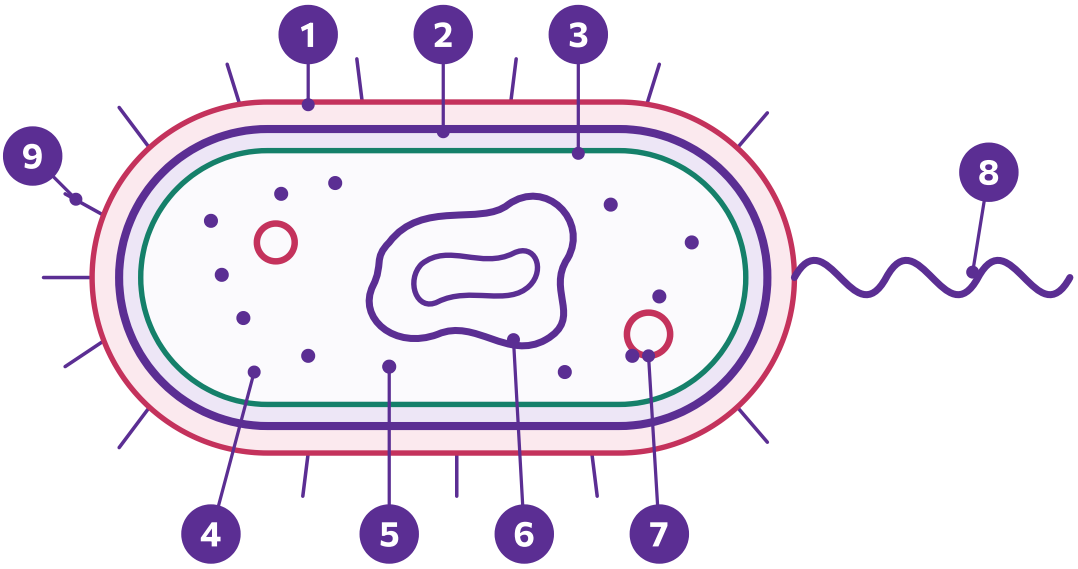


Βάκιλοι με ενδοσπόρια
ραβδόμορφα



Σπειρύλλια
σπειροειδή

Δομή βακτηριακού κυττάρου



Το βακτήριο είναι προκαρυωτικό κύτταρο: το DNA του δεν περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη. Τα πλασμίδια είναι γνωστά από τα Κεφάλαια 1 και 4.

1. Κάψα
2. Κυτταρικό τοίχωμα
3. Πλασματική μεμβράνη
4. Κυτταρόπλασμα
5. Ριβοσώματα
6. Πυρηνοειδές (περιοχή με το DNA)
7. Πλασμίδιο
8. Μαστίγιο
9. Ινίδια (κροσσοί)

---

8 Υπολογισμοί με τον χρόνο διπλασιασμού

Στην εκθετική φάση ο πληθυσμός διπλασιάζεται κάθε φορά που περνά χρόνος ίσος με τον χρόνο διπλασιασμού. Αν ξεκινήσουμε από N_0 κύτταρα και γίνουν n διπλασιασμοί:

$$N = N_0 \times 2^n \quad \text{με} \quad n = t / T$$

N: τελικός αριθμός κυττάρων. N_0: αρχικός αριθμός. t: χρόνος στην εκθετική φάση. T: χρόνος διπλασιασμού.

Λυμένο παράδειγμα

Μια καλλιέργεια ξεκινά με 500 βακτήρια που έχουν χρόνο διπλασιασμού 20 λεπτά και βρίσκονται σε εκθετική φάση. Πόσα βακτήρια θα υπάρχουν μετά από 2 ώρες;

t = 2 ώρες = 120 λεπτά, άρα n = 120 / 20 = 6 διπλασιασμοί. $N = 500 \times 2^6 = 500 \times 64 =$ **32.000 βακτήρια**.

Χρόνος (λεπτά)	0	20	40	60	80	100	120
Κύτταρα	500	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000

Κόλπο για τις ασκήσεις

Ο τύπος ισχύει **μόνο για την εκθετική φάση**. Αν η άσκηση δίνει λανθάνουσα φάση, αφαίρεσε πρώτα τη διάρκειά της από τον συνολικό χρόνο. Γράψε τον χρόνο t και τον χρόνο διπλασιασμού T στην ίδια μονάδα.

Προσοχή

Ο χρόνος διπλασιασμού αφορά συγκεκριμένες συνθήκες. Αν αλλάξει η θερμοκρασία, το pH ή το οξυγόνο, αλλάζει και αυτός.

9 Συγκρίσεις

Κλειστή και συνεχής καλλιέργεια

Κριτήριο	Κλειστή καλλιέργεια	Συνεχής καλλιέργεια
Φάσεις	Λανθάνουσα, εκθετική, στατική και φάση θανάτου.	Λανθάνουσα και εκθετική. Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται διαρκώς σε ανάπτυξη.
Εξωτερική επέμβαση	Δεν επεμβαίνουμε, εκτός από την αρχική προσθήκη θρεπτικού υλικού και τον εμβολιασμό.	Τροφοδοτούμε συνεχώς την καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό και ρυθμίζουμε τις συνθήκες.
Τοξικά προϊόντα	Δεν απομακρύνονται.	Απομακρύνονται διαρκώς, μαζί με τα νεκρά κύτταρα.
Πότε παράγονται τα χρήσιμα προϊόντα	Συνήθως στην εκθετική και στη στατική φάση.	Στην εκθετική φάση.

Λανθάνουσα και στατική φάση

Κριτήριο	Λανθάνουσα φάση	Στατική φάση
Πότε εμφανίζεται	Στην αρχή της καλλιέργειας, αμέσως μετά τον εμβολιασμό.	Μετά την εκθετική φάση.
Γιατί ο πληθυσμός είναι σταθερός	Οι μικροοργανισμοί προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες.	Εξαντλήθηκε κάποιο θρεπτικό συστατικό ή συσσωρεύτηκαν τοξικά προϊόντα.
Τι ακολουθεί	Η εκθετική φάση.	Η φάση θανάτου.

Υγρό και στερεό θρεπτικό υλικό

Κριτήριο	Υγρό θρεπτικό υλικό	Στερεό θρεπτικό υλικό
Σύσταση	Θρεπτικά συστατικά διαλυμένα σε νερό.	Υγρό θρεπτικό υλικό με άγαρ.
Πώς αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί	Διασκορπισμένοι σε όλο τον όγκο του υγρού.	Στην επιφάνεια, σε αποικίες.
Κύρια χρήση	Ανάπτυξη μεγάλου αριθμού κυττάρων, ζύμωση στον βιοαντιδραστήρα.	Απομόνωση μικροοργανισμών.

Εργαστηριακή και βιομηχανική καλλιέργεια

Κριτήριο	Εργαστηριακή καλλιέργεια	Βιομηχανική καλλιέργεια
Κλίμακα	Μικρή: δοκιμαστικοί σωλήνες, φιάλες, τρυβλία Petri.	Μεγάλη: βιοαντιδραστήρες.
Θρεπτικό υλικό	Υγρό ή στερεό.	Υγρό.
Σκοπός	Απομόνωση και μελέτη του μικροοργανισμού, δημιουργία της αρχικής καλλιέργειας.	Παραγωγή του προϊόντος σε μεγάλες ποσότητες.
Ρύθμιση συνθηκών	Επώαση σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία.	Συνεχής έλεγχος θερμοκρασίας, pH και συγκέντρωσης O_2.

Συχνά λάθη

> **Η βιομάζα δεν είναι οι πρωτεΐνες**
> Βιομάζα είναι τα ίδια τα κύτταρα, όχι οι ουσίες που παράγουν.

> **Στη συνεχή καλλιέργεια ο πληθυσμός δεν μένει σταθερός**
> Τα κύτταρα βρίσκονται διαρκώς σε εκθετική φάση.

> **Στη λανθάνουσα φάση ο πληθυσμός δεν μειώνεται**
> Μένει σχεδόν σταθερός, και η αιτία είναι η προσαρμογή, όχι η έλλειψη θρεπτικών συστατικών.

> **Η ζύμωση δεν είναι μόνο αναερόβια**
> Ο όρος καλύπτει κάθε ανάπτυξη μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό.

> **Αυτότροφοι και ετερότροφοι**
> Οι αυτότροφοι παίρνουν τον άνθρακα από το CO_2, οι ετερότροφοι από υδατάνθρακες. Μην τα αντιστρέφεις.

Mycobacterium και *Clostridium*

Το πρώτο είναι υποχρεωτικά αερόβιο, το δεύτερο υποχρεωτικά αναερόβιο. Προαιρετικά αερόβιοι είναι οι μύκητες της αρτοβιομηχανίας.

10 Αυτοέλεγχος

Δώδεκα γρήγορες ερωτήσεις. Οι απαντήσεις είναι στο τέλος.

1. Το άγαρ είναι:

α) πρωτεΐνη που παράγουν τα βακτήρια
β) πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη
γ) πηγή αζώτου για τους μικροοργανισμούς
δ) ένα αντιβιοτικό

2. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε pH:

α) 2–4
β) 4–5
γ) 6–9
δ) 9–12

3. Υποχρεωτικά αναερόβια είναι τα βακτήρια του γένους:

α) Mycobacterium
β) Clostridium
γ) Penicillium
δ) κανένα από αυτά

4. Στη λανθάνουσα φάση ο πληθυσμός των μικροοργανισμών:

α) διπλασιάζεται με ταχύ ρυθμό
β) μένει σχεδόν σταθερός, γιατί οι μικροοργανισμοί προσαρμόζονται
γ) μειώνεται
δ) μένει σταθερός, γιατί εξαντλήθηκαν τα θρεπτικά συστατικά

5. Η βιομάζα είναι:

α) οι πρωτεΐνες που παράγουν οι μικροοργανισμοί
β) το θρεπτικό υλικό του βιοαντιδραστήρα
γ) τα ίδια τα κύτταρα που υπάρχουν στον βιοαντιδραστήρα
δ) τα τοξικά προϊόντα του μεταβολισμού

6. Ποια φάση δεν εμφανίζεται στη συνεχή καλλιέργεια;

α) Η λανθάνουσα
β) Η εκθετική
γ) Η στατική
δ) Εμφανίζονται όλες

7. **Ως πηγή άνθρακα οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν:**

α) υδατάνθρακες
β) το CO_2
γ) αμμωνιακά ιόντα
δ) το άγαρ

8. **Σε άριστες συνθήκες η E. coli διπλασιάζεται περίπου κάθε:**

α) 2 λεπτά
β) 20 λεπτά
γ) 2 ώρες
δ) 20 ώρες

9. **Ένα προϊόν εκκρίνεται από τα κύτταρα στο θρεπτικό υλικό. Μετά τον διαχωρισμό αναζητείται:**

α) στα στερεά συστατικά
β) στα υγρά συστατικά
γ) στο άγαρ
δ) στη βιομάζα

10. **Οι μικροοργανισμοί διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα στους:**

α) 37 °C
β) 4 °C
γ) −20 °C
δ) −80 °C

11. **Ένα προϊόν που συντίθεται στη στατική φάση παράγεται με:**

α) συνεχή καλλιέργεια
β) κλειστή καλλιέργεια
γ) οποιονδήποτε από τους δύο τύπους
δ) καλλιέργεια σε τρυβλίο

12. **Μια καλλιέργεια σε εκθετική φάση έχει 100 βακτήρια με χρόνο διπλασιασμού 30 λεπτά. Μετά από 1,5 ώρα θα έχει:**

α) 300
β) 400
γ) 800
δ) 1.600

Απαντήσεις

1. **β)** Χρησιμεύει για να στερεοποιεί το θρεπτικό υλικό. Είναι ρευστό πάνω από τους 45 °C.
2. **γ)** Εξαίρεση τα βακτήρια του γένους Lactobacillus, που αναπτύσσονται σε pH 4–5.

3. **β)** Για το Clostridium το οξυγόνο είναι τοξικό. Το Mycobacterium είναι υποχρεωτικά αερόβιο και το Penicillium είναι μύκητας.
4. **β)** Η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών εξηγεί τη στατική φάση, όχι τη λανθάνουσα.
5. **γ)** Προϊόντα της ζύμωσης είναι η βιομάζα και, χωριστά, τα προϊόντα των κυττάρων, όπως οι πρωτεΐνες και τα αντιβιοτικά.
6. **γ)** Τα θρεπτικά συστατικά ανανεώνονται και τα άχρηστα προϊόντα απομακρύνονται, οπότε τα κύτταρα μένουν σε εκθετική φάση.
7. **β)** Οι ετερότροφοι χρησιμοποιούν υδατάνθρακες. Τα αμμωνιακά ιόντα είναι πηγή αζώτου.
8. **β)** Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής της είναι 37 °C.
9. **β)** Τα στερεά συστατικά είναι τα κύτταρα. Ο διαχωρισμός γίνεται με διήθηση ή φυγοκέντρηση.
10. **δ)** Στην κατάψυξη αδρανοποιούνται και μένουν αναλλοίωτοι, ώστε να υπάρχει πάντα αρχική καλλιέργεια.
11. **β)** Στη συνεχή καλλιέργεια τα κύτταρα δεν φτάνουν ποτέ στη στατική φάση.
12. **γ)** 90 λεπτά / 30 = 3 διπλασιασμοί, άρα $100 \times 2^3 = 800$ βακτήρια.

Σημειώσεις Βιολογίας Προσανατολισμού Γ΄ Λυκείου. Κεφάλαιο 7.