

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

ЕКОЛОГІЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ

з дисципліни

для студентів спеціальності 6.070800 „Екологія

та охорона навколишнього середовища”

напряму 0708 “Екологія”

денної форми навчання

СХВАЛЕНО

на засіданні кафедри

біохімії та екології

харчових виробництв

Протокол № 7

від 03.02.05 р.

Київ НУХТ 2005

Екологічна біотехнологія: Конспект лекцій з дисципліни для студ. спец. 6.070800 “Екологія та охорона навколишнього середовища” напряму 0708 „Екологія” ден. форми навч. / Уклад. Н.О.Бублієнко. – К.: НУХТ, 2005. – ... с.

Укладач **Н.О.Бублієнко**, канд. техн. наук

Відповідальний за випуск **Л.В. Левандовський**, д-р техн. наук, проф.

1. ЕКОЛОГІЧНА СИТУАЦІЯ ТА РОЛЬ БІОТЕХНОЛОГІЇ В ЇЇ ПОКРАЩАННІ

Біотехнологія – це сукупність технологій, що передбачають використання живих організмів та біологічних процесів у промисловому виробництві.

Об'єктами біотехнології є переважно бактерії, дріжджі, гриби, віруси, клітини рослин і тварин, біологічно активні речовини спеціального призначення тощо.

Методами біотехнології є поверхневе, глибинне культивування в періодичному та безперервному режимах; вирощування рослинних і тваринних клітин в особливих умовах. Здебільшого біотехнологічні процеси проходять в асептичних умовах.

Екологічна біотехнологія – це специфічне використання біотехнології для вирішення проблем охорони навколишнього природного середовища.

На Третньому з'їзді Європейської асоціації біотехнологів у 1984 р. *історію біотехнології* було поділено на п'ять періодів – ер:

- допастерівська (до 1865 р.);
- післяпастерівська (1866 – 1940 рр.);
- антибіотиків (1941 – 1960 рр.);
- керованого біосинтезу (1961 – 1975 рр.);
- нової біотехнології (після 1975 р.).

Інтенсифікація сільського господарства, бурхливий розвиток промисловості, транспорту призвели до диспропорцій у навколишньому середовищі, деформації встановленої рівноваги екосистем, погіршення екологічної ситуації в усіх сферах діяльності людини. Екологічна біотехнологія може допомогти у вирішенні багатьох екологічних проблем (див. таблицю).

Біотехнологічні методи захисту довкілля

Метод	Сфера застосування або субстрат	Суть методу
1	2	3
Створення безвідходних технологічних процесів	Народне господарство	Отримання з відходів корисних продуктів або знешкодження їх
Створення препаратів для боротьби зі збудниками хвороб людини та тварин	Охорона здоров'я і ветеринарія	Створення засобів для діагностики, імуностимулятори, вакцини, антибіотики тощо
Створення рослин, стійких до хвороб та шкідників	Сільське господарство	Отримання рослин, при вирощуванні яких відпадає необхідність використання отрутохімікатів
Біологічні методи боротьби з хворобами і шкідниками рослин	Сільське лісове господарство і	Селективне знищення спеціальними біологічними препаратами шкідливих комах, гризунів чи збудників хвороб
Бактеріальні добрива, стимулятори росту рослин	Сільське господарство	Посилення біологічної фіксації атмосферного азоту, мобілізації фосфору; прискорення росту органів рослин; зниження потреб у мінеральних добривах
Створення рослин, здатних фіксувати атмосферний	Те саме	Перенесення у геном рослин генів від мікроорганізмів, що визначають фіксацію

Закінчення табл.

1	2	3
азот без участі мікроорганізмів		
Аеробне біоочищення стоків	Комунальні та виробничі стоки	Утилізація органічних речовин стоків активним мулом у присутності кисню
Анаеробне біоочищення стоків	Те саме	Утилізація органічних речовин анаеробним мулом з утворенням біогазу
Селективна утилізація хімічних сполук стоків	Промислові стоки	Утилізація токсичних речовин спеціально адаптованими культурами мікроорганізмів
Кероване компостування твердих відходів	Сільське господарство, міські звалища	Біологічна деструкція частини компонентів відходів з утворенням компосту
Детоксикація хімічних забруднень ґрунтів	Ґрунт	Утилізація шкідливих сполук мікробіологічною обробкою ґрунтів
Біосорбція металів	Стоки	Селективна сорбція у спеціальних біофільтрах металів зі стоків мікроорганізмами
Біологічне очищення викидів	Газоподібні викиди	Використання мікроорганізмів для деструкції забруднень викидів
Діагностика ступеня забруднення середовища	Стоки, ґрунт, повітря	Контроль присутності певних речовин у середовищі за допомогою ферментів
Виробництво енергії з біомаси	Народне господарство	Виробництво біогазу за допомогою метанового бродіння
Клонування	Живі організми	Відновлення чисельності популяції

Питання до самоперевірки

1. Об'єкти, основні методи біотехнології.

2. Історія розвитку біотехнології.
3. Екологічна біотехнологія. Роль біотехнології у захисті та оздоровленні довкілля.

2. Біохімічні основи екологічної біотехнології.

Анаболізм та катаболізм – основні процеси метаболізму

Усі реакції, що проходять у клітині, поділяють на *анаболічні* – асиміляція (синтез складних молекул з більш простих) та *катаболічні* – дисиміляція (розщеплення складних молекул до простих компонентів). Перші супроводжуються витратами, другі – виділенням енергії. Сукупність катаболічних та анаболічних реакцій, що проходять у клітині в будь-який даний момент, становить її метаболізм:

Взаємозв'язок між катаболічними та анаболічними шляхами зображено на схемі 1.

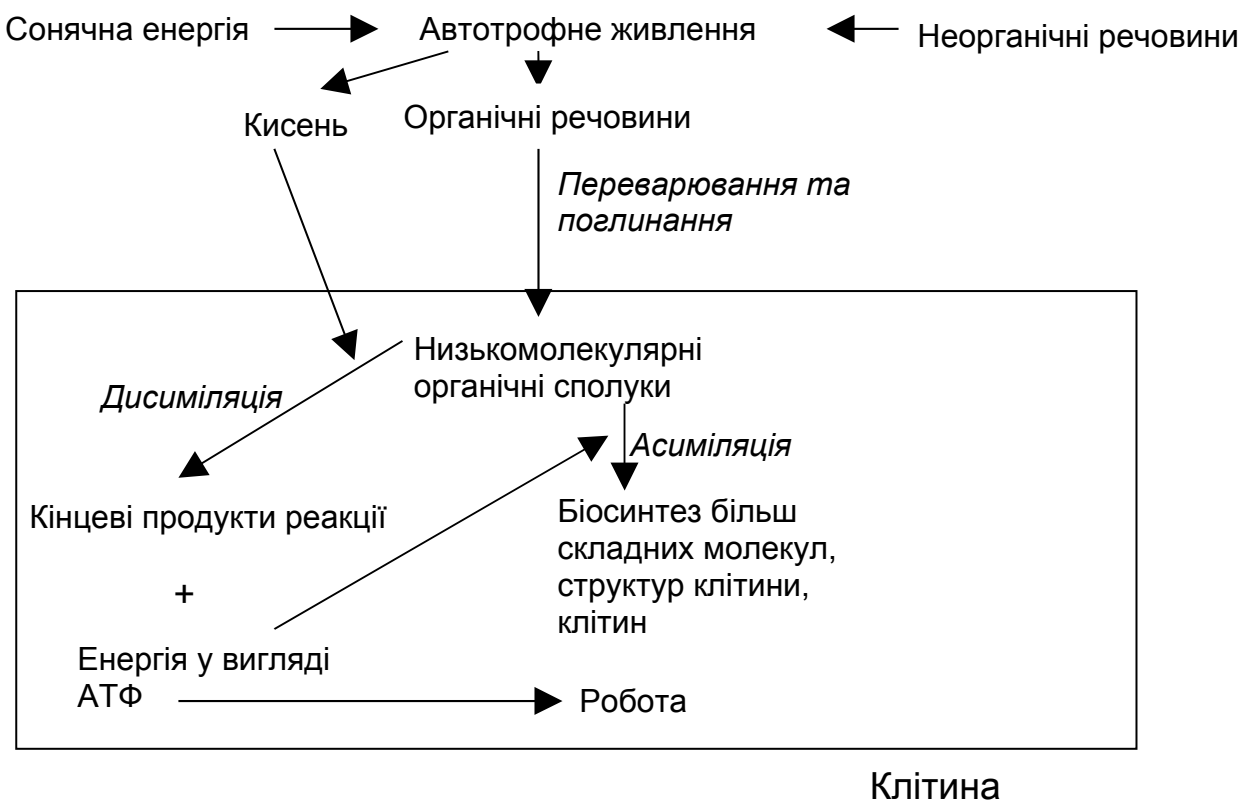


Схема 1

У живих організмах розщеплення речовин відбувається у присутності кисню (аеробний обмін) та за відсутності кисню (анаеробний обмін).

Питання до самоперевірки

1. Асиміляція. Дисиміляція. Метаболізм.
2. Взаємозв'язок процесів асиміляції та дисиміляції в живій клітині.

3. Розклад речовин в аеробних умовах

В аеробному катаболізмі розрізняють три головні стадії (схема 2). На стадії I макромолекули клітини розпадаються на основні будівельні блоки.

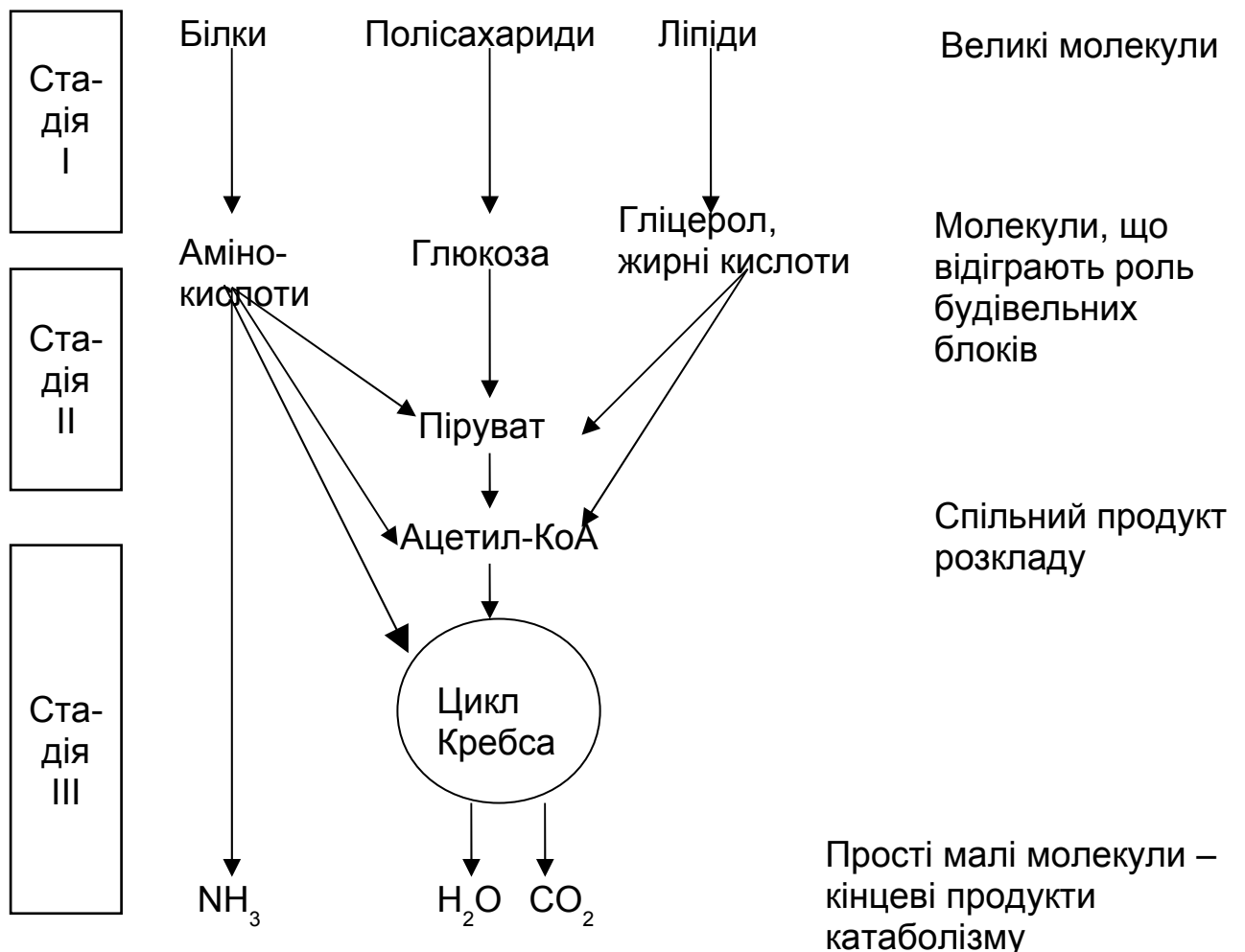


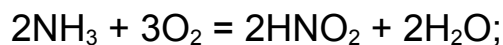
Схема 2

Останні на стадії II перетворюються на ще простіші сполуки (піруват, ацетилкофермент А). На стадії III ацетил-КоА вступає в цикл трикарбонових кислот – спільний кінцевий шлях, на якому майже всі види

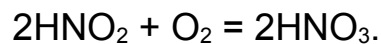
клітинного палива окиснюються до двоокису вуглецю. Кінцевими продуктами є також вода та аміак.

При аеробному диханні відбувається відновлення коферментів окисно-відновних ферментів (НАД, ФАД), які надходять у дихальний ланцюг. Перехід водню по дихальному ланцюгу супроводжується виділенням енергії, що акумулюється в АТФ.

В екологічній біотехнології процеси аеробного розкладу лежать в основі компостування відходів, очищення стоків тощо. Завершальна стадія аеробного окиснення стоків полягає у *нітрифікації* амонійних сполук під впливом нітрифікуючих бактерій. Цей процес поділяється на дві фази. У першій фазі, яку здійснюють бактерії роду *Nitrosomonas*, аміак окиснюється до нітритів:



у другій, яку здійснюють бактерії роду *Nitrobacter*, нітрити окиснюються в нітрати:



Питання до самоперевірки

1. Схема та характеристика основних стадій аеробного катаболізму.
2. Значення процесів аеробного розкладу в екологічній біотехнології.
3. Біохімізм та мікробіологія процесів нітрифікації.

4. Розклад речовин в анаеробних умовах

Порівняно з аеробним окисненням, бродіння є еволюційно давнішим і енергетично менш вигідним, хоча для деяких видів організмів бродіння є єдиним джерелом енергозабезпечення.

При *молочнокислому бродінні* утворюються молочна кислота (гомоферментативний процес), оцтова кислота, спирти, CO_2 (гетероферментативний). Гомоферментативне молочнокисле бродіння здійснюють молочнокислі стрептококки та палички; гетероферментативне – бактерії *Leuconostoc*. Молочнокисле бродіння застосовують у

виробництві молочнокислих продуктів; молочної кислоти з побічного продукту цукрової промисловості (меляси), гідролізатах відходів сільського господарства; у консервуванні харчових та кормових продуктів (силосування жому, відходів плодоовочевої промисловості).

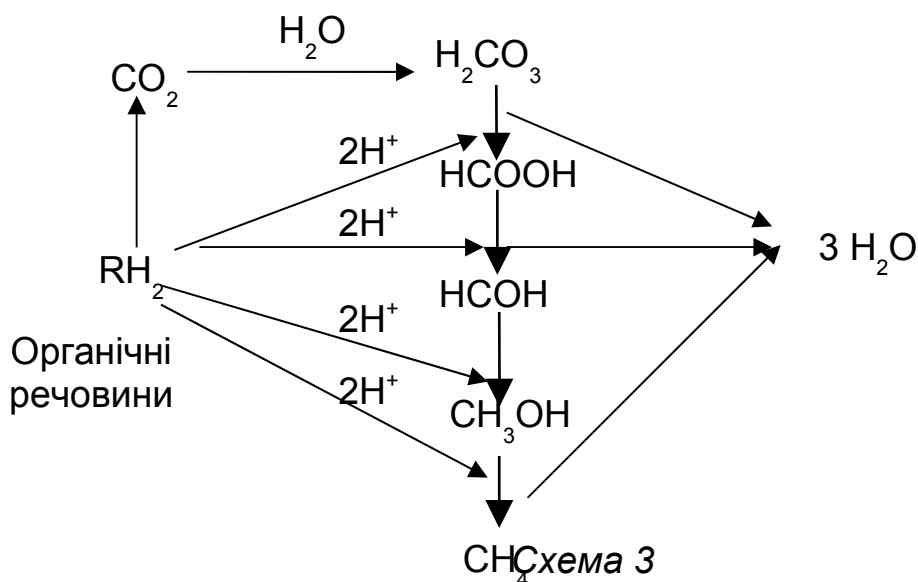
Процес *спиртового бродіння* відбувається під впливом дріжджів роду *Saccharomycetes* і лежить в основі біотехнологічного виробництва пива, вина; спирту із зерна; картоплі або з побічного продукту цукрового виробництва – меляси.

Метанове бродіння застосовують для очищення стічних вод, утилізації відходів, отримання біогазу, добрив з вмістом вітаміну B_{12} .

Метанове бродіння відбувається при різних температурах. Виділяють психрофільне ($< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), мезофільне ($20 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) та термофільне ($45 - 65\text{ }^{\circ}\text{C}$) бродіння.

До *метаногенних бактерій* належать *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanothrix*, *Clostridium*.

Процес метаногенезу зображена на схемі 3:



Професор Г.О. Нікітін довів [6], що проміжним продуктом у процесі метанового бродіння є ацетил-КоА. Це пояснює, чому у процесі бродіння накопичується оцтова кислота: з огляду на фізико-хімічні умови, нестачу водню тощо ацетил-КоА не повністю трансформується в метан та CO_2 , а частково перетворюється на оцтову кислоту.

Кількість та якісний склад біогазу залежить від виду субстрату, ступеня його забруднення, умов перебігу процесу тощо. Енергетична цінність 1 м³ біогазу, що містить 60 % метану, дорівнює 22 – 24 МДж і еквівалентна 0,65 – 0,7 л умовного палива.

Активний мул, що накопичується в метантенках, збагачений вітамінами кобаламінової групи. Так, концентрація вітаміну В₁₂ в ньому становить 45 – 50 мкг/г сухих речовин залежно від умов проведення процесу.

Питання до самоперевірки

1. Види молочнокислого бродіння; мікроорганізми, що його викликають; значення в біотехнології.
2. Біохімізм, мікробіологія та значення спиртового бродіння.
3. Температурні режими метанового бродіння.
4. Основні метаногенні бактерії.
5. Біохімізм та значення метанового бродіння в екологічній біотехнології.

5. Проблема розкладу складних субстратів у екологічній біотехнології

Існує проблема розкладу утворюваних у технологічних процесах складних речовин, які будучи основною масою відходів, створюють загрозу навколишньому середовищу. Завданням екологічної біотехнології є їх руйнування та перетворення на нешкідливі для довкілля або використання як вторинну матеріальну сировину для виробництва кормових і харчових продуктів.

Целюлоза (клітковина) – це полісахарид, що утворює головну масу клітинних стінок рослин. Нерозчинний у воді, лише набухає в ній.

Фермент целюлоза гідролітично розщеплює клітковину з утворенням целобіози. Целюлаза міститься у пророслому зерні, деяких бактеріях та пліснявих грибах.

Анаеробне збродження клітковини у природних умовах здійснюють целюлозоруйнівні бактерії (*Clostridium omelianskii* тощо). Кінцеві продукти збродження клітковини – оцтова, мурашина, молочна кислоти, метан, водень, вуглекислий газ. Анаеробні целюлозні бактерії поширені у ґрунтах, мулах, водоймах, травному тракті та гної жуйних тварин. Особливо багато їх у метантенках, де зброджуються осади.

Найшвидше целюлоза розкладається в аеробних умовах під впливом бактерій (*Myxobacterales* та *Cytophagales*), грибів (*Fusarium*, *Trichoderma*) та актиноміцетів.

Пектинові речовини – це високомолекулярні сполуки вуглеводної природи, що містяться у великій кількості в ягодах, фруктах, клубнях та стеблах рослин. Існують у вигляді нерозчинного протопектину, що являє собою сполуки метоксильованої полігалактуринової кислоти з галактаном або арабаном клітинної стінки.

Пектинові речовини розщеплюються під дією ряду ферментів. Під впливом протопектинази протопектин розщеплюється на вільну метоксильовану полігалактуринову кислоту та арабан і галактан. Вільна метоксильована полігалактуринова кислота гідролізується під впливом пектази (пектинестерази), утворюючи метиловий спирт та полігалактуринову кислоту. Полігалактуриназа (пектиназа) каталізує гідроліз глюкозидних зв'язків між залишками галактуринової кислоти.

Препарати, що містять пектиноруйнівні ферменти, отримують з пліснявих грибів і застосовують у харчовій промисловості для освітлення вин, соків та збільшення їх виходу.

Пектинові речовини можуть також розкладатись анаеробними бактеріями *Clostridium pectinovorum*; грибами роду *Botrydis*, аспергіловими грибами *Asp. niger*, *Asp. Awamory* в аеробних умовах.

Стоки, що містять **нафтопродукти**, утворюються у процесі виробництва кормового білка на вуглеводнях нафти, на нафтопереробних заводах, у морських портах тощо.

На доступність сполук дії мікроорганізмів впливають: кількість атомів вуглецю, що утворюють ланцюг алканів, та розгалуженість вуглеводнів. Розклад вуглеводнів можливий лише у присутності молекулярного кисню.

До використання розгалужених алканів більш придатні *Mycobacterium* та *Nocardia*. На ароматичних вуглеводнях добре розвиваються *Bacterium benzolicum*, *B. toluolicum*. Вуглеводні швидше руйнуються змішаними культурами мікроорганізмів. Досить поширено отримання кормового білка вирощуванням на нафтопродуктах дріжджів роду *Candida*.

Вченими НУХТ отримано бактеріальний препарат “Лестан”, який використовують для очищення ґрунту та вод від нафтопродуктів.

Кератини належать до групи протеїноїдів – фібрилярних білків, що виконують в організмі механічні функції і мають підвищену стійкість до дії води та хімічних реагентів. Кератини входять до складу рогів, копит, шерсті, волосся, пір’я, пуху.

Висока стійкість кератину до хімічних реагентів, ферментів зумовлена великою кількістю поперечних дисульфідних зв’язків ($-S-S-$) між пептидними ланцюгами. Гідроліз, відновлення чи окиснення, механічна обробка кератину приводять до утворення розчинного продукту, що розщеплюється протеолітичними ферментами.

Питання до самоперевірки

1. Розклад целюлози в аеробних та анаеробних умовах. Целюлозоруйнівні організми.
2. Будова та особливості розкладу пектинових речовин.
3. Використання біотехнологій для захисту довкілля від забруднення нафтопродуктами.

6. Мікробіологічні аспекти екологічної біотехнології

Сукупність живильного середовища та мікроорганізмів, що ростуть у ньому, називають **культуральною рідиною**, а сукупність виростлих

мікроорганізмів – **культурою**. Культура може бути однорідною – чистою (складатись з клітин одного й того ж виду) та неоднорідною – змішаною (являти собою асоціацію клітин різних видів організмів).

В асоціаціях мікроорганізми перебувають у симбіотичних або антагоністичних відносинах. Поняття **симбіоз** означає, що організми дають один одному користь при спільному існуванні.

Існують різні форми **симбіотичних** взаємовідносин:

метабіоз – співіснування, при якому один організм споживає продукти обміну іншого;

сателізм – стимуляція життєдіяльності одного організму іншим;

синергізм – посилення ферментативних функцій або поява нових властивостей, не властивих кожній окремій із змішаної культури.

Форми **антагоністичних** відносин такі:

типовий антагонізм – продукти метаболізму одного організму згубні для іншого;

конкуренція – боротьба між організмами за поживні речовини тощо;

хижацтво – один вид організмів є джерелом живлення для іншого;

паразитизм – один з організмів (паразит) живе на іншому (господарі) або всередині його і живиться за його рахунок.

Розглянемо механізм симбіотичних та антагоністичних відносин на прикладі очисних споруд каналізації.

Основна роль у вилученні зі стічної рідини розчинених, колоїдних та завислих речовин належить **бактеріям**. Вони здатні досить легко пристосовуватись до несприятливих навколишніх умов, робити стоки доступними для інших організмів, виступати як біоіндикатори. Найбільш розповсюдженими є представники родів *Pseudomonas*, *Bacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Bacillus*.

Наприкінці процесу біологічного очищення з'являються нітрифікуючі бактерії. Сіркобактерії розвиваються у присутності сірковмісних речовин (білків), особливо при недостатній аерації

Гриби належать до активних мінералізаторів, здатні засвоювати токсичні сполуки. На очисних спорудах зустрічаються в основному плісняві багатоклітинні гриби *Fusarium*, *Nematosporangium*. Масовий розвиток грибів перешкоджає осадженню мулу у вторинному відстійнику, тому є небажаним.

Водорості – зустрічаються у біологічних ставках, на полях зрошення та фільтрації, біофільтрах. Водорості сприяють звільненню стічних вод від сполук азоту та фосфору, збагачують середовище киснем.

Найпростіші – це мікроскопічні одноклітинні тварини, класифікація яких базується на способах руху: саркодові, джгутикові та інфузорії.

Роль найпростіших полягає у сприянні очищенню та освітленню води, обмеженні кількості бактерій, виконанні функції біоіндикаторів.

Поява в аеротенку великої кількості дрібних амеб, джгутикових – ознака неякісного очищення. Невелика кількість великих амеб властива нормально працюючому мулу.

До класу інфузорій належить найбільша кількість індикаторних організмів. *Paramecium caudatum*, *Glaucoma scintillans*, *Litonotus lamella* пристосовані до існування в умовах низького вмісту кисню, тому розвиваються у разі порушення роботи споруди. У перевантаженому мулі в значній кількості фіксують *Podophrya* та *Tokophrya*. Представники родів *Cyclidium*, *Oxitricha*, *Stilonichia*, *Aspidisca* зустрічаються в задовільно працюючому мулі.

Черви та коловертки зазвичай присутні в очисних спорудах. Коловертки дуже чутливі до змін зовнішніх умов, тому є індикаторними організмами: при зниженні концентрації кисню втрачають рухомість, витягаються та відмирають; при різкій зміні складу стоків гинуть у стисненому стані. Із малоцетинкових червів поширений *Aelosoma*. Частими мешканцями біофільтрів є круглі черви, надмірний розвиток яких може призвести до затрудненого потоку води.

Також на очисних спорудах зустрічаються личинки та лялечки комах, водяні кліщі, нижчі рачки. Живлячись найпростішими та відмерлою біоплівкою, ці організми сприяють повнішій мінералізації органічних речовин.

Питання до самоперевірки

1. Поняття “культуральна рідина”, “культура мікроорганізмів”.
2. Форми симбіотичних та антагоністичних відносин в асоціаціях мікроорганізмів.
3. Населення очисних споруд каналізації: основні представники, джерела живлення, роль у процесі очищення стічних вод.

7. Технологічні аспекти екологічної біотехнології.

Особливості культивування мікроорганізмів

При *поверхневому способі* мікроорганізми вирощують на поверхні живильного середовища, де до клітин є вільний доступ кисню. *Глибинний спосіб* базується на вирощуванні мікроорганізмів у глибині середовища за рахунок кисню, розчиненого в рідині. Переваги глибинного культивування: непотрібність великих площ та громіздкого обладнання; простота обслуговування; можливість автоматизації; зручність виділення продуктів метаболізму.

За *періодичного процесу* всі компоненти вносять на початку ферментації. Склад середовища, концентрація біомаси та метаболітів весь час змінюється як результат метаболізму клітин.

У процесі культивування спостерігають такі *фази росту* (рис. 1):

1) *лаг-фаза* 1, протягом якої не відбувається помітне збільшення кількості клітин. Це період адаптації до нових умов культивування. Тривалість лаг-фази залежить від природи мікроорганізмів, віку клітин, кількості посівного матеріалу, складу живильного середовища, фізико-хімічних показників тощо;

2) *фаза експоненційного росту 2* (лог-фаза), протягом якої відбувається максимальний приріст біомаси та спостерігається використання субстрату з максимальною швидкістю; у реальних умовах такий процес триває недовго, до відчутних змін хімічного складу середовища;

3) *фаза лінійного росту 3*;

4) *фаза уповільнення росту 4*, коли швидкість росту культури знижується до нуля;

5) *стаціонарна фаза 5*, коли настає рівновага, тобто кількість відмерлих клітин дорівнює кількості тих, що з'явилися у результаті розмноження;

6) *фаза відмирання культури 6*, що настає, якщо система повністю вичерпується за субстратом або накопичення продуктів обміну є значним.

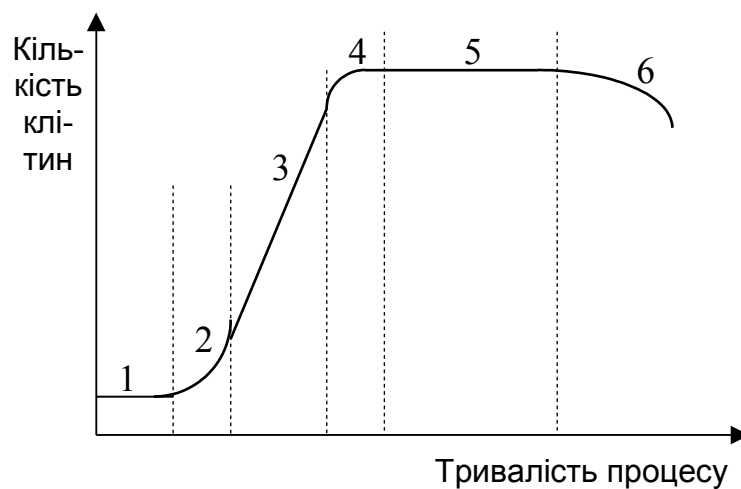


Рис. 1

Розвиток культур мікроорганізмів характеризують:

швидкість росту культур — зміна концентрації біомаси за проміжок часу, г/год:

$$v = (x_1 - x_0) / (t_1 - t_0) = dx/dt;$$

питома швидкість росту, год⁻¹:

$$\mu = v/x;$$

час генерації, год:

$$g = \ln 2 / \mu;$$

економічний коефіцієнт – відношення приросту біомаси Δx до кількості спожитого субстрату Δs :

$$Y = \Delta x / \Delta s;$$

трофічний коефіцієнт, що визначає затрати субстрату на приріст біомаси:

$$\alpha = \Delta s / \Delta x.$$

Напівбезперервне культивування здійснюється від'ємно-доливним або доливним способом.

При *безперервному* способі культивування в апарат постійно надходить живильне середовище, а з нього виходять продукти життєдіяльності разом з надлишком клітин.

Переваги безперервного культивування: висока продуктивність апарата; отримання якісно однорідного продукту; можливість повної автоматизації процесу; зниження витрат на обслуговування та виробничі площі; підтримка культури в активному стані протягом тривалого часу.

Безперервний спосіб культивування характеризується такими показниками:

швидкість потоку F , м³/год, – це кількість середовища W , що поступає в апарат за одиницю часу:

$$F = W / t;$$

швидкість розбавлення D , год⁻¹, – відношення швидкості потоку до об'єму апарата V :

$$D = F / V;$$

тривалість перебування мікроорганізмів в апараті, год:

$$\tau = 1 / D.$$

При безперервному процесі питома швидкість розмноження клітин має дорівнювати швидкості розбавлення середовища:

$$\mu = D.$$

При $\mu > D$ кількість біомаси в апараті буде постійно збільшуватись до такого стану, коли настає лімітування за поживними речовинами. При $\mu < D$ відбувається вимивання клітин з апарата.

Контроль і керування процесами безперервного культивування мікроорганізмів здійснюється двома способами: хемостатним та турбідостатним.

У *хемостаті* з постійною швидкістю надходить живильне середовище і відбувається відтік культури. Живильне середовище містить у надлишку всі компоненти середовища за винятком якогось одного. Цей компонент виступає в ролі фактора, що обмежує ріст клітин мікроорганізмів.

Якщо швидкість росту клітин перевищує швидкість вимивання мікроорганізмів, рівень біомаси буде рости, концентрація компонента, що лімітує ріст, почне знижуватись. У результаті швидкість росту клітин також буде знижуватись доти, доки не зрівняється зі швидкістю їх вимивання.

Якщо швидкість росту культури виявиться нижчою за швидкість вимивання клітин, рівень біомаси почне падати. Останнє приведе до збільшення концентрації лімітуючого компонента середовища, що приведе до урівнювання швидкості росту клітин із швидкістю вимивання.

При *турбідостатному* культивуванні підтримується постійний рівень біомаси, який реєструється пристроєм із фотоелементом за оптичною щільністю культури. Як тільки рівень біомаси в культурі піднімається вище деякого наперед вибраного рівня, сигнал фотоелемента приводить в дію насос, що подає свіже живильне середовище.

Питання до самоперевірки

1. Культивування організмів. Види ферментації.
2. Поверхневий та глибинний способи культивування. Особливості напівбезперервної ферментації.
3. Періодичне культивування. Основні фази росту мікроорганізмів. Фактори, що впливають на їх тривалість.

4. Кількісні показники росту культур мікроорганізмів.
5. Безперервне культивування. Переваги та основні показники процесу.
6. Способи керування процесами безперервного культивування.

8. Особливості культивування клітин рослин і тварин

Історія розвитку технологій культивування клітин рослин і тварин

1892 – 1902 рр. – культивування німецькими дослідниками Г. Хаберландтом, В. Фьохтінгом та іншими у розчині сахарози рослинних тканин, отримання ними первинного калусу і визначення мінімального розміру сегмента, здатного до калусогенезу;

1902 – 1922 рр. – створення перших живильних середовищ для культивування тканин тварин;

1922 – 1932 рр. – доведення американським ученим В. Робінсом та німецьким дослідником Г. Котте можливості культивування на твердих живильних середовищах фрагментів рослин;

1932 – 1940 рр. – доведення французьким вченим Р. Готре можливості тривалого культивування в умовах *in vitro* рослинних тканин за рахунок періодичного перенесення на свіже середовище;

1940 – 1960 рр. – відкриття нових класів фітогормонів;

1960 – 1975 рр. – мікророзмноження рослин в умовах *in vitro*;

1975 р. і донині – швидкий розвиток техніки *in vitro*, вдосконалення методу глибинного культивування клітин, розроблення методів мутагенезу тощо.

Рослинні клітини культивують у вигляді **калусу** – сукупності недиференційованих клітин, які ростуть хаотично і утворюють клітинну масу.

Техніка введення в культуру in vitro

Стерилізація. Органи рослин, з яких беруть експлант, миють у мильному розчині, дистильованій воді, стерилізують в етанолі, засобі, що

містить активний хлор чи ртуть. Середовище, посуд, апаратуру стерилізують автоклавуванням, ультрафільтрацією, опроміненням.

Живильні середовища для культивування мають включати всі необхідні рослинам макро- та мікроелементи, вітаміни, вуглеводи, амінокислоти, фітогормони.

Умови культивування:

більшість калусних тканин не потребує світла;

вологість у культуральній кімнаті має становити 60 – 70 %;

температура 25–26 °C.

Особливості калусних клітин:

з'являються специфічні білки;

ріст відбувається неорганізовано, асинхронно та є необмеженим;

клітинний цикл триваліший, ніж у рослин відкритого ґрунту;

гетерогенність за віком;

споживають менше кисню.

Загальна схема отримання суспензійних культур для виробництва вторинних біологічно активних речовин:

виділення експлантів та їх поверхнева стерилізація;

перенесення у стерильний посуд з живильним середовищем;

культивування при температурі 25 °C, отримання калусу;

перенесення калусу у рідке середовище в колби на 100 – 150 мл (на качалках) для створення суспензії;

перехід до об'ємнішого культивування (колби місткістю 0,5 – 3 л на качалках);

перенесення у 5 – 10 л лабораторні ферментери;

інокуляція суспензії у ферментери місткістю 50 л.

Останніми роками створено технологію *клонального мікророзмноження* організмів. Термін “клон” (від грец. *clon* – паросток) було запропоновано Г.Вебером у 1903 р. Клон – це культура, що складається з генетично однорідних клітин.

Переваги клонального мікро розмноження:

значно вищі коефіцієнти розмноження;
мініатюризація процесу;
можливість оздоровлення отриманих рослин;
скорочення тривалості селекційного процесу;
можливість укорінення тих рослин, які зовсім не розмножуються або погано розмножуються звичайним способом;
прискорення переходу рослин до репродуктивної фази розвитку;
можливість автоматизації процесу вирощування.

Етапи клонального мікророзмноження рослин:

вибір рослини-донора, ізолювання експлантів та отримання стерильної культури, що активно росте;
власне мікророзмноження;
укорінення розмножених пагонів з наступною адаптацією їх до ґрунтових умов;
вирощування рослин в умовах теплиці та підготовка до реалізації або висаджування в поле.

Останнім часом активно розвивається галузь біотехнології, що досліджує отримання та можливе використання *трансгенних рослин*. Трансгеноз – перенесення будь-яким способом чужорідних генів у клітини рослин. У 1999 р. кількість трансгенних рослин у світі досягала 120 і вони займають більше 40 млн га посівних площ. Основні площі посівів трансгенних культур зосереджені у США, Аргентині, Канаді та Китаї.

Трансгенні рослини мають специфічні позитивні риси:

стійкість до шкідників, гербіцидів, вірусів, хвороб;
підвищена якість за рахунок збалансованості складу, більшого вмісту цінної речовини;
здатність зберігатись більш тривалий час без втрати якості;
стійкість до стресових чинників середовища;
здатність виступати продуцентами фармакологічних речовин;

здатність краще засвоювати мінеральні сполуки.

Оцінка ризику використання трансгенних рослин:

сконструйовані гени можуть передаватись з пилом спорідненим диким видам і бур'янам;

можуть витіснити інші рослини;

можуть стати прямою загрозою для людини, домашні і диких тварин внаслідок токсичності чи алергійності;

можуть непрогнозованим чином змінити екологічні взаємодії між видовими спільнотами, вбудовуючись та змінюючи існуючі трофічні ланцюжки міжвидових взаємодій.

Дослідження показують, що екологічний ризик при вирощуванні трансгенних рослин можна порівняти з ризиком випробовування нових селекційних сортів. Але, звичайно, у кожному разі введення нового гена у рослини, останні слід ретельно перевіряти.

Трансгенні тварини – тварини, у геном яких інтегровані різноманітні чужорідні генні конструкції. Метою трансгенезу є отримання тварин з удосконаленими якостями :

вплив на розміри чи швидкість росту тварин;

стійкість до захворювань;

селективний вплив на продукти, отримувані від тварин;

отримання БАП медичного та технологічного призначення; органів та тканин для пересадки людині;

вплив на слаборегульовані фізіологічні процеси.

Включення чужорідного гена, окрім очікуваного ефекту, може стати причиною *небажаних побічних явищ*: порушення функціонування тієї ділянки хромосоми, де відбулось включення гена; зміна метаболізму на рівні всього організму; поява жіночої стерильності; кульгавість, виразка шлунку. Тому всі експерименти з отриманням трансгенних тварин не мають виходити з-під контролю; потрібна старанна дослідницька

селекційна робота з отриманими трансгенними тваринами та їх нащадками.

Біобезпека – це захищеність людини та довкілля від можливої шкідливої дії речовин, які містяться у природних або генетично модифікованих біологічних об'єктах та отриманих з них продуктах.

Важливим етапом оцінювання біобезпеки генно-інженерно-модифікованих організмів та отриманих з них продуктів є санітарно-гігієнічна експертиза, яка включає перевірку:

хімічного складу початкових та трансгенних об'єктів;
біологічної цінності та засвоюваності приготованих із ГМО продуктів;
можливості викликати алергію чи впливати на імунітет;
на токсичність, канцерогенність чи мутагенність;
вплив на репродуктивні функції людини та тварин.

Питання до самоперевірки

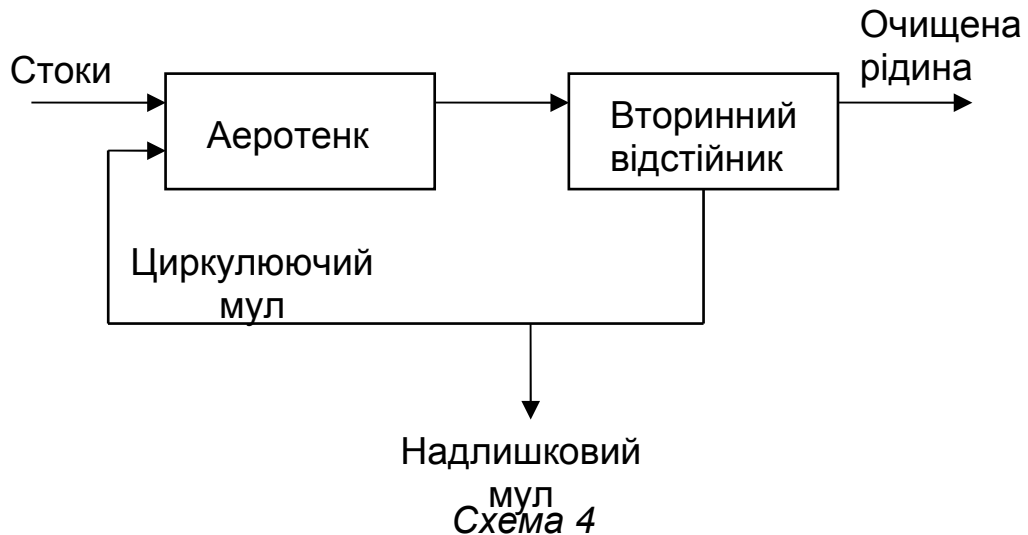
1. Особливості культивування клітин рослин і тварин. Історія розвитку цього напрямку біотехнології.
2. Поверхневе культивування клітин рослин. Техніка введення в культуру *in vitro*.
3. Особливості калусних клітин.
4. Загальна схема отримання суспензійних культур для виробництва вторинних біологічно активних речовин:
5. Переваги технології клонального мікророзмноження організмів. Етапи клонального мікророзмноження.
6. Нові корисні властивості трансгенних рослин. Оцінка ризику їх використання.
7. Трансгенні тварини. Мета трансгенезу. Оцінка можливих негативних побічних явищ.
8. Поняття про біобезпеку.

9. Практичні напрями екологічної біотехнології.

Очищення стічних вод

Аеробні процеси очищення стічних вод

Процес очищення стоків можна зобразити у вигляді схеми 4:



Процес біологічного очищення стічних вод в аеротенках охоплює три стадії. На першій відбуваються змішування стоків з активним мулом, окиснення легкоокиснювальних речовин; на другій – окиснення важкоокиснювальних речовин та регенерація активного мулу, на третій – процес нітрифікації амонійних солей.

Термін “активний” щодо мулу означає, що біомаса:

являє собою мікрофлору, що містить всі ферментні системи, необхідні для деградації забруднень;

має поверхню з сильною адсорбційною здатністю;

здатна утворювати стабільні флокули, які легко осаджуються у процесі відстоювання.

Основні показники активного мулу

Активний мул аеротенків має вигляд жовтувато-бурих пластівців, що містять різні види організмів. До складу активного мулу входять бактерії, гриби, найпростіші, черви, коловертки тощо.

Концентрація мулу, г/л, яка залежно від типу стоків, особливостей процесу очищення, перебуває в межах 1,5 – 5 г/л.

Муловий індекс дорівнює об'єму, що його займає 1 г активного мулу після півгодинного відстоювання (у перерахунку на сухі речовини).

Навантаження на активний мул за органічними речовинами P , мг БСК/гдобу:

$$P = \text{БСК} / at,$$

де a – кількість активного мулу, г/л; БСК – біологічне споживання кисню, г/л; t – тривалість аерації, діб.

Вік мулу T , діб:

$$T = aV / QP,$$

де V – об'єм аеротенка, м³; Q – об'єм стоків, що надходить в аеротенк, м³/добу; P – приріст мулу, г/л.

Залежно від виду стоків мул проявляє уреазну, ліполітичну, амілазну або загальну дегідрогеназну ферментативні активності.

Аеротенки класифікують за такими ознаками:

за структурою потоку – аеротенки-витискувачі, аеротенки-змішувачі та аеротенки з розосередженим впуском стічної рідини;

за способом регенерації активного мулу – аеротенки з окремо розташованими регенераторами мулу; аеротенки, сполучені з регенераторами;

за навантаженням на активний мул – високонавантажені, звичайні та низько навантажені;

за числом ступенів – одно-, дво- та багатоступеневі;

за конструктивними ознаками – прямокутні, круглі, комбіновані, протиточні тощо;

за типом систем аерації – з пневматичною, механічною, комбінованою гідродинамічною та пневмомеханічною.

Пневматична система – повітря нагнітається в аеротенк під тиском через фільтросні пластини та труби, диски, тканинні аератори тощо.

При *механічній* системі аерації повітря залучається в аеротенк під час обертання у ньому рідини мішалкою-аератором.

На схемах потоків у різних аеротенках (рис. 2) а – аеротенк-витискувач; б – змішувач; в – з розподіленим впуском води; г – з регенератором; 1 – аеротенк; 2 – вторинний відстійник; 3 – регенератор; I – стічна вода; II – активний мул; III – мулова суміш.

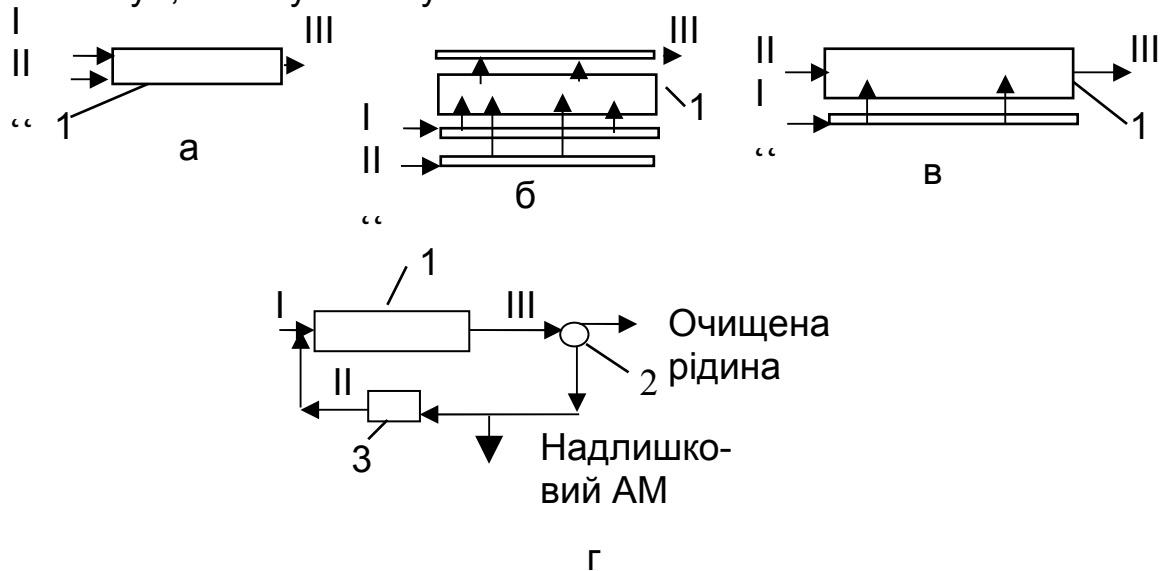


Рис. 2

Біофільтри являють собою споруди, в яких очищення проводять пропусканням стоків через крупнозернистий фільтрувальний матеріал, покритий біологічною плівкою, утвореною колоніями аеробних мікроорганізмів.

Біофільтри безперервної дії за пропускнуою здатністю можуть бути поділені на крапельні та високонавантажені.

Крапельні біофільтри іноді називають зрошувальними, або перколяторними; в них повітря надходить природним шляхом.

Високонавантажені біофільтри відрізняються від крапельних значно більшим навантаженням стічних вод. *Конструктивними відмінностями є:*

- збільшення крупності зернин завантаженого матеріалу;
- штучна продувка матеріалу завантаження повітрям;
- збільшення висоти шару фільтрувального завантаження.

До експлуатаційних особливостей належать:

обов'язкове зрошення всієї поверхні біофільтрів надходжуваною водою і зменшення тривалості перерв у подаванні води на поверхню;
збільшення навантаження по воді;
введення рециркуляції стоків.

Високонавантажені біофільтри *класифікують* за такими ознаками.

за принципом дії – такі, що працюють з повним або з неповним біоочищенням;

за способом подавання повітря – з природною та штучною аерацією;

за режимом роботи – з рециркуляцією та без рециркуляції;

за числом ступенів – одно- та двоступеневі;

за висотою – низькі – до 2 м, високі – від 2 м і вище;

за конструктивними особливостям завантаження – з об'ємним (щебінь, керамзит, гравій) та з площинним завантаженням (металеві сітки, пластмасові плівки, синтетичні тканини тощо).

Анаеробні процеси очищення стічних вод

Анаеробні процеси мають цілий ряд надзвичайно важливих *переваг*:

По-перше, розширюється діапазон стічних вод, придатних до біологічного очищення: можливе ефективне очищення стоків з ХСК більше 1 – 2 г/л;

По-друге, очищення здійснюється з меншим споживанням біогенних добавок. Так, стічні води із співвідношенням БСК₅:N:P, що дорівнює (300 – 500):7:1, цілком придатні для анаеробного очищення, тоді як аеробна технологія потребувала б доведенням цього співвідношення до 100:5:1;

По-третьє, наявність експлуатаційних переваг: ліквідує необхідність установки повітродувок та живлення їх електроенергією; позбавляє проблем, пов'язаних з піноутворенням у процесі оброблення стоків, що містять поверхнево-активні речовини; підвищує стійкість біологічних систем до тривалих перерв у живленні стічною водою; полегшує автоматизований

контроль та керування процесом біологічного очищення; дозволяє зменшити площу очисної станції.

По-четверте, полегшується утилізація кінцевих продуктів біологічного очищення, даючи змогу значно скоротити кількість утвореного мулу; використовувати без попереднього санітарного оброблення надлишкову біомасу від реакторів, що працюють у термофільному режимі, як добриво або добавку до комбікорму; отримувати біогаз, що містить близько 70 % метану та є альтернативним паливом.

Недоліком експлуатації анаеробних установок є довготривалість періоду їх первинного запуску, зумовлена відносно повільним ростом анаеробів порівняно з аеробами; необхідність доочищення стоків після метантенків, що пов'язано з накопиченням проміжних продуктів бродіння.

Для *інтенсифікації* процесу бродіння мікроорганізми закріплюють на поверхні якогось носія; використовують UASB-реактори – з висхідним потоком стічної води крізь шар анаеробного активного мулу.

Питання до самоперевірки

1. Загальна схема оброблення стоків у аеробних умовах.
2. Основні стадії біологічного очищення стічних вод в аеротенках.
3. Поняття “активний мул”.
4. Основні показники активного мулу.
5. Класифікація аеротенків.
6. Схеми потоків у різних типах аеротенків. Їх переваги й недоліки.
7. Системи аерації в аеротенках.
8. Класифікація біофільтрів. Загальна характеристика крапельних біофільтрів.
9. Конструкційні та експлуатаційні відмінності високонавантажених біофільтрів.
10. Класифікація високонавантажених біофільтрів.
11. Анаеробне очищення стічних вод. Переваги та недоліки.
12. Інтенсифікація процесу метанового бродіння.

10. Тверді відходи

Невід'ємною вадою життєдіяльності суспільства є утворення відходів. Пошук способів їх ліквідації, безпечних для здоров'я населення і таких, що не забруднюють довкілля, являє собою одне з першочергових завдань. В галузі переробки та ліквідації твердих відходів біотехнологічними методами одне з найзначніших місць як за вартістю, так і за об'ємними показниками належить утилізації мулу стоків та твердих комунальних відходів.

Так, кількість твердих відходів, що утворюються в результаті перероблення стоків, у Франції дорівнює 800 тис. т на рік (за сухими речовинами), у Великобританії – 1240 тис., у США – 4500 тис. Існує ряд осадів з різними характеристиками, що зумовлені їх природою та ступенем переробки:

- первинний – утворюється у первинному відстійнику;
- гумований – надлишкова біологічна плівка з крапельних біофільтрів;
- активний – флокульована біомаса, що утворюється при очищенні стоків активним мулом;
- вторинний – активний або гумований мул;
- сирий мул – не оброблений жодним зі способів.

Переробка мулу

Концентрування. Різні типи сирих осадів стічних вод спершу не мають високої концентрації твердих компонентів. Тому згідно з сучасними теоріями утилізації мулу, слід забезпечувати певний ступінь зневоднення ще до початку основних процесів перероблення. Це досягається відстоюванням, центрифугуванням, флотацією, фільтруванням тощо.

Модифікація мулу здійснюється додаванням хімікатів, що діють як коагулянти або флокулянти. Це неорганічні солі або органічні полімери з різною молекулярною масою та властивостями.

Анаеробне збродження – витримування мулу в анаеробних умовах протягом тривалого часу при температурі 30 – 37 °C або 45 – 50 °C.

Аеробна стабілізація мулу – це тривале оброблення мулу в спорудах типу аеротенків-стабілізаторів, у процесі якої відбувається окиснення органічних речовин у присутності мікроорганізмів та кисню повітря, яке вводиться примусово.

Ліквідація мулу

Захоронення у ґрунті. До 30 % мулу застосовують як добриво у сільському господарстві. Таке використання мулу вигідне як з погляду зростання врожайності, покращання властивостей ґрунту, так і ліквідації мулу як відходу. Цей спосіб ліквідації може ускладнюватись присутністю патогенних мікроорганізмів і токсичних елементів.

Захоронення у морі. Широко застосовується у Великобританії. Інші європейські країни менше використовують цей метод. Захоронення мулу (й інших твердих відходів) у морі регулюється щорічними ліцензіями, в яких визначено місця скидання, а також кількість та якість скидуваного матеріалу.

Спалювання. Відіграє значну роль у технологіях ліквідації мулу, прийнятих у Франції, Данії.

Знезараження мулу

Пастеризація. Використовується для попередження розповсюдження *Salmonella* при внесенні мулу на поля. Здійснюється нагріванням до температури 70 °C та витримуванням протягом 30 хвилин.

Термообробка. Використовуються набагато жорсткіші умови, ніж при пастеризації – високий тиск та температура близько 200 °C. Мета термообробки – покращання властивостей мулу перед зневодненням та отримання стабільних та інертних твердих часточок.

Термофільне збродження. Дає можливість досягти значного рівня знезараження.

Компостування відходів

Компостування – це екзотермічний процес аеробного біологічного розкладу відходів в умовах підвищеної температури та вологості. У процесі

біодеградації органічний субстрат піддається фізичним та хімічним перетворенням з утворенням стабільного гуміфікованого кінцевого продукту, який використовується у сільському господарстві як добриво та як засіб, що покращує структуру ґрунтів, підвищує їх стійкість до ерозії.

Відходи, що піддаються компостуванню: міське сміття, гній тваринницький ферм, відходи рослинництва, сирий активний мул тощо.

Організми, що беруть участь у компостуванні: бактерії, актиноміцети, гриби, водорості, найпростіші, вищі гриби, багатоніжки, кліщі, черви, мурашки тощо.

Процес компостування поділяють на чотири стадії:

мезофільна – відходи мають температуру навколишнього середовища, рН слабокисле. Мікроорганізми, присутні у відходах, починають швидко розмножуватись, у процесі розщеплення ними органічних сполук виділяється енергія, температура піднімається до 40 °С, рН підкисляється;

термофільна – при підвищенні температури понад 40 °С починають гинути мезофіли та переважати термофіли. Це піднімає температуру до 60 °С, процес розкладання речовин продовжують споротворні бактерії та актиноміцети, гриби стають неактивними. Гинуть термочутливі патогенні мікроорганізми, бур'яни та їх насіння. рН стає лужним;

охладження – рН повільно падає, але лишається лужним. Швидкість тепловиділення стає дуже низькою, температура знижується до температури навколишнього середовища;

дозрівання – втрати маси та тепловиділення малі, процес триває декілька місяців.

Параметри процесу компостування:

склад – сировина для компостування має містити максимум органічного матеріалу та мінімум неорганічних відходів;

дисперсність частинок – розмір частинок для механізованих установок з перемішуванням та примусовою аерацією – 12,5 мм, для нерухомих куп з природною аерацією – 50 мм;

поживні речовини – вміст елементів у відходах, як правило, є оптимальним для здійснення процесу компостування, лише співвідношення C/N та зрідка рівень фосфору можуть потребувати коригування. C/N має перебувати у межах 25/1;

вологість – має бути в межах 50 – 60;

аерація – оптимум – 10 – 18 % кисню;

перемішування – здійснюється для забезпечення киснем усіх зон компостної маси та диспергування крупних фрагментів сировини;

розміри купи – будь-яка довжина, висота 1,5 м та ширина 2,5 м для куп та компостних рядів з природною аерацією. У разі примусової аерації розміри купи мають перешкоджати перегріву.

Питання до самоперевірки

1. Характеристика надлишкового мулу очисних станцій.
2. Основні способи перероблення, знезараження та ліквідації надлишкового мулу очисних станцій.
3. Суть процесу компостування. Організми, що беруть у цьому участь.
4. Основні стадії та параметри процесу компостування.

11. Імобілізація клітин

Клітинна імобілізація – це процес, у перебігу якого клітини прикріплюються до якоїсь поверхні.

Імобілізація клітин може бути природнім процесом або викликана хімічними чи фізичними способами, якщо використання імобілізованих клітин є вигідним при проведенні процесу.

Переваги та способи вдосконалення процесу

1. Можливість проведення безперервного реакційного процесу при будь-якому потоці рідини без ризику вимивання клітин.
2. Досягнення надзвичайно високої концентрації клітин, що веде до збільшення загальної продуктивності системи.
3. Легке відділення іммобілізованих клітин від рідкої фази.
4. Можливість багаторазового культивування з використанням тих же клітин.
5. Посилюється масообмін між газовою та рідкою фазами.
6. Можливість іммобілізувати клітини кількох видів відокремлено один від одного.

Іммобілізація має деякі обмеження:

може викликати зміни у метаболізмі та фізіології клітин, наслідком чого є зменшення продуктивності;

приготування іммобілізованих клітин часто є більш витратне порівняно з традиційними методами.

Методи клітинної іммобілізації

Методи клітинної іммобілізації поділяються на групи згідно з тим, який фізичний процес лежить в їх основі: прикріплення, проникнення, включення чи агрегація.

Прикріплення (рис. 3) – форма іммобілізації, при якій клітини яким-небудь чином прикріплюються до поверхні або твердого носія. Прикріплення може бути наслідком природної адгезії або індукуватись хімічно.

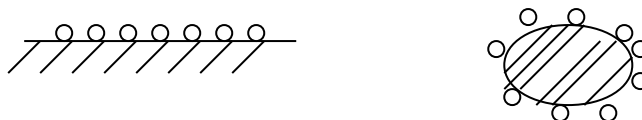


Рис. 3

Клітини, не здатні до природного прикріплення до поверхні, можуть бути прикріплені за допомогою хімічних сполук (зшивання за допомогою

глутарового альдегіду). У цих випадках міцність прикріплення така сама, як за природної адгезії.

Прикріплені клітини контактують з навколишнім середовищем, частково відділяються від носія та переходять у рідку фазу, тому даний спосіб не застосовують, якщо треба залишити рідину безклітинною.

Проникнення (рис. 4) – клітини самовільно потрапляють у пористі структури та, накопичуючись у процесі росту, “попадають у пастку”. Цей процес може відбуватись на мікроскопічному рівні на частинках мікропористого носія (цегли, коксу, кераміки) або на макроскопічному рівні, де частинки мають великі пори (до 0,1 мм) (сталевий дріт, скручений у клубок; сітчастий пінополіуретан).

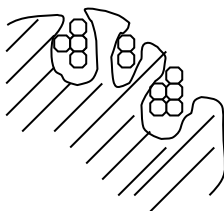


Рис. 4

Клітини, що проникли у носій, захищені від механічного відриву під впливом зовнішніх дій, але не відділені від навколишнього середовища якоюсь межею, тому не можна вважати робоче середовище повністю вільним від клітин.

Включення (рис. 5) – іммобілізація включенням клітин у заздалегідь підготовану або утворену оболонку. Такою оболонкою може служити межа розділення фаз між двома рідинами, що не змішуються.

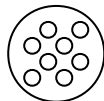


Рис. 5

Такі системи дають можливість повністю очистити робоче середовище від клітин.

Агрегація (рис. 6) – іммобілізація об'єднанням клітин з утворенням великих агрегатів. Для посилення агрегації можуть використовуватись штучні флокулянти, які сприяють об'єднанню.



Рис. 6

Типи реакторів з іммобілізованими клітинами

1. Реактори повного змішування. Для запобігання руйнуванню іммобілізованих клітин при перемішуванні, мішалку вміщують у пористу комірку або лопаті мішалки виготовляють із сітчастих кошиків, в які вміщують частинки носія.
2. Реактор з нерухомим шаром. Досягаються більш високі характеристики процесу та хороша керованість процесу за рахунок рециркуляції. Недоліком таких реакторів є можлива деформація насадки під впливом статичного тиску шару та тиском потоку.
3. Реактори з псевдорозрідженим шаром. Частинки суспендовані у висхідному потоці рідини.
4. Ерліфтні апарати.
5. Анаеробні реактори з висхідним потоком.

Питання до самоперевірки

1. Клітинна іммобілізація. Переваги, недоліки, способи вдосконалення процесу.
2. Методи клітинної іммобілізації.
3. Типи реакторів з іммобілізованими клітинами.

12. Біотехнологічні альтернативи у сільському господарстві

Пробіотики

Антибіотики, що використовуються у тваринництві все частіше та все більш невпорядковано, приводять до широкого розповсюдження у мікробних популяціях фактора стійкості до них.

Останніми десятиріччями як безпечна альтернатива антибіотикам для попередження і для лікування шлункових розладів у тварин та людини розглядають препарати молочнокислих бактерій (пробіотики). Запропоновано препарати, що складаються з індивідуальної або змішаної культури молочнокислих бактерій *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus* та *Streptococcus faecium* з додаванням вітамінів.

Антибактеріальна роль молочнокислих бактерій зумовлена їх здатністю: виробляти достатню кількість кислоти, щоб пригнічувати інші мікроорганізми; прикріплюватись до кишкових ворсинок, “витісняючи” інші бактерії; виробляти метаболіти, які нейтралізують токсини систем травлення тварин та людини.

Бактерії – симбіонти бобових

Азотні добрива стали досить дорогими, спричиняють хімічне забруднення довкілля, тому увагу науковців сконцентровано на альтернативах азотних добрив, до яких належить азотфіксація. Досліджують бактерії, здатні вступати у симбіотичні відношення з бобовими рослинами (горох, люпин, соя, люцерна, конюшина тощо). До таких бактерій належать бактерії роду *Rhizobium*, виділені з корневих бульбочок бобових.

Усі види *Rhizobium* мають значну специфічність щодо рослини-господаря.

Види *Rhizobium* заражають клітини коренів бобових, стимулюють їх поділ для утворення молодих бульбочок, всередині яких вони розвиваються як внутрішньоклітинні симбіонти та фіксують атмосферний азот. Окремо ні бобові, ні бактерії *Rhizobium* не можуть засвоювати азот.

Для інтенсифікації процесу азотфіксації бобові попередньо інокують специфічними симбіонтами. Препарати азотфіксуючих мікроорганізмів виробляють у різних видах: у рідкому та замороженому, ліофілізованому, на торфовому носії. Використовують також як носії

вугільний пил, буряковий жом. Ефективний носій має бути нетоксичним, мати високу адсорбційну здатність, легко змішуватись та стерилізуватись, бути недорогим.

Існує два основних способи, якими можна інокулювати бобові рослини препаратами ризобактерій: пряме внесення у ґрунт разом з насінням та попередня інокуляція насіння перед посівом.

Бактеріальне добриво, що містить активну культуру *Rhizobium*, називається нітрагін. Вперше нітрагін в Росії був приготований у 1911 р. бактеріолого-агрономічною станцією у Москві.

Існують також вільноіснуючі азотфіксатори: *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter chroococcum*. На основі останнього розроблено препарат азотобактерин для обробки насіння.

Виробництво силосу

Для успішного здійснення процесу силосування використовують *силосні добавки*. За їх дією на процес ферментації добавки поділяють на дві групи: інгібітори та стимулятори ферментації. *Інгібітори* – це кислотні добавки (сірчана та мурашина кислоти) та консерванти (формальдегід). *Стимулятори* – джерела вуглеводів (патока, барда), добавки молочнокислих бактерій чи ферментів.

Критеріями для включення молочнокислих бактерій у силосні добавки виступають:

швидкий ріст та здатність до швидкого домінування над іншою мікрофлорою;

гомоферментативність;

стійкість до кислот, хоча б при рН 4;

здатність зброджувати гексози, пентози;

здатність до росту при температурі до 50 °С.

Зазвичай молочнокислі бактерії, що входять до складу біологічних добавок при силосуванні, представлені *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*.

Природні методи боротьби зі шкідниками. Біопестициди

Існують п'ять основних категорій природних або біологічних методів боротьби з шкідниками.

1. Боротьба за допомогою природних ворогів.

Переваги ентомопатогенних препаратів біологічного походження: мають високу специфічність, не чинять пригнічуючого впливу на рослини. Як мікробні пестициди використовують бактерії, гриби, віруси, інші організми.

Відомо понад 90 видів бактерій, що інфікують комах. Більша частина належить сімействам *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*. Основна частина ентомопатогенних препаратів виготовлена з *Bacillus thuringiensis* (Bt). Перший промисловий продукт був виготовлений у Франції у 1938 р. Препарати Bt становлять 0,1 % світового виробництва пестицидів, але більше 90 % всіх мікробних пестицидів. Різні штами використовують проти гусені, метеликів, комарів, мошки, молі.

Відомо понад 400 видів грибів, що заражають комах та кліщів.

Гриб *Beauveria bassiana* діє на колорадського жука у вигляді препарату під назвою боверін.

Вірусні ентомопатогенні препарати здатні вражати ядра та ліпідні структури комах; їх виробляють у вигляді препарату „вірин” (діє на капустяну совку, білого американського метелика).

2. Селекція та генетичні методи боротьби. Їх основу становить розвиток у видів-господарів стійкості до ураження. Цей метод широко використовують щодо пригнічення грибкових, вірусних та бактеріальних хвороб рослин.

3. Використання стерильних самців. Цей метод передбачає масове розповсюдження у природній популяції спеціально оброблених особин комах, не здатних до запліднення та отримання потомства.

4. Культурні методи боротьби. Являють собою нехімічну зміну одного або кількох факторів навколишнього середовища таким чином, що

воно стає непридатним для шкідників або вони не можуть в нього проникнути:

а) санітарно-гігієнічна боротьба зі шкідниками;

б) агротехнічна боротьба з шкідниками газонів, садів та полів (рослини слід вирощувати в оптимальних для них умовах; регулювання часу сівби; знищення залишків сільськогосподарських культур; введення сівозміни; митний контроль та карантин тощо).

5. *Природні засоби хімічної боротьби.* Передбачають використання феромонів – речовин, що виділяються організмом у зовнішнє середовище для впливу на поведінку інших особин свого виду. Переваги природних хімікатів: висока специфічність; нетоксичність.

Перевагою всіх названих методів є те, що вони спрямовані лише на підтримання кількості шкідників нижче небезпечного рівня, але не на повне їх знищення, щоб не порушити екологічний баланс.

Найраціональнішим є використання комплексного підходу боротьби із шкідниками, який поєднує в собі різні методи.

Питання до самоперевірки

1. Біотехнологічні альтернативи у сільському господарстві. Пробіотики.

2. Бактерії – симбіонти бобових. Бактеріальні добрива – азотобактерин та нітрагін.

3. Виробництво силосу. Силосні добавки.

4. Критерії для включення молочнокислих бактерій у силосні добавки.

5. Загальна характеристика біологічних методів боротьби із шкідниками.

6. Мікробні пестициди.

13. Екологічна біотехнологія – основа енергетики майбутнього

Виробництво етилового спирту з нетрадиційної сировини

Нині більше половини світового виробництва етанолу використовується як добавку до палива для двигунів внутрішнього згоряння і лише 15 % – для виробництва спиртних напоїв. Так, у 1998 р. світове виробництво етанолу становило 31 млрд л, з них харчового – близько 4 млрд л, для хімічної промисловості – близько 8 млрд л, паливного – близько 20 млрд літрів.

Як паливо етанол можна використовувати у безводному вигляді (99,8 %), у суміші з бензином (його частка досягає близько 20 %) , у формі гідратованого етанолу (94 %), не змішаного з бензином.

Використання такого палива дає змогу суттєво зменшити вміст шкідливих компонентів у вихлопних газах (СО, оксидів азоту, інших токсичних викидів).

Вважають, що паливний етанол має найбільший потенціал серед інших видів палива з біомаси, враховуючи невичерпні джерела його отримання. Основним способом здешевлення цього продукту може бути заміна традиційної сировини для отримання спирту на сорго, топінамбур (земляну грушу), цукрову тростину, цукровий буряк та дерев'янисті рослини (вільха, осика), відходи сільського господарств та деревообробної промисловості, побутове сміття.

У виробництві етанолу на такій сировині спершу відбувається гідроліз целюлози та геміцелюлози, а потім їх зброджування дріжджами до етанолу. Нині розробляють технології об'єднаного ферментативного гідролізу целюлози та геміцелюлози і ферментації отриманих вільних цукрів до етанолу.

Виробництво біогазу

Одним із можливих способів одержання енергії з біомаси тваринного та рослинного походження є її анаеробне зброджування. Як сировину для одержання біогазу можна використовувати органічні відходи сільського

господарства (солома, бадилля, трава тощо), відходи харчових та переробних підприємств, осади стічних вод, гній з тваринницьких ферм.

У процесі зброджування таких відходів можна отримати значний вихід біогазу з високим вмістом метану. Так, при метановому обробленні картопляних відходів утворюється 0,455 м³ біогазу на 1 кг сухої органічної речовини, бадилля цукрового буряку – 0,452, відходів томатів – 0,750. Вихід біогазу при збродженні стоків свинокомплексів сягає 20 – 25 м³ з 1 м³ гною.

Біогаз можна використовувати для виробництва електроенергії, спалювання для отримання тепла, накачування в балони для використання на транспорті.

Виробництво біогазу з біомаси має такі *переваги*:

біомаса постійно відновлюється;

біомаса є джерелом екологічно чистої енергії;

активний мул, що накопичується в процесі бродіння. є високоякісним добривом;

процес сприяє підтриманню чистоти довкілля за рахунок утилізації відходів.

У світі вже існує близько 1000 високоефективних біогазових установок (як промислових, так і централізованих сільськогосподарських), спроектованих на високому інженерному рівні. 44 % з них – у Європі, 14 % – у Північній Америці.

Виробництво вуглеводнів за допомогою *Botryococcus braunii*

В одноклітинній водорості *Botryococcus braunii* 15 – 75 % від маси сухої речовини становлять вуглеводні (у деяких вищих рослин це співвідношення дорівнює приблизно 1 %).

Вуглеводні накопичуються у клітинній стінці, що дає можливість виділяти вуглеводні простим центрифугуванням, не руйнуючи клітини, які після видалення вуглеводнів можна повернути у культуральне середовище.

У штучних умовах можливий вихід вуглеводнів до 60 т/га/на рік, які можливо використовувати як джерела енергії або як сировину для нафтохімічної промисловості.

Фотовиробництво водню та перетворення енергії сонячного світла

Водень називають паливом майбутнього. Цей газ можна використовувати у побуті замість природного і як автомобільне паливо. Недоліком є те, що водень практично не зустрічається на Землі у вільному вигляді; він весь окиснився до води.

Встановлено, що хлоропласти рослин та бактеріальні екстракти, що містять гідрогеназу, після опромінення видимим світлом можуть здійснювати фотоліз води, тобто її розщеплення з виділенням водню.

Важливість такої форми отримання енергії зумовлена:

- наявністю надлишку субстрату для фотолізу (води);
- нелімітованим джерелом енергії (сонячне світло);
- можливістю зберігання водню;
- незабрудненням атмосфери при використанні водню як палива;
- високою теплотворною здатністю водню (29 ккал/г порівняно з 3,5 ккал/г для вуглеводнів);
- можливістю відновлення процесу, оскільки після видалення водню субстрат (вода) регенерує;
- перебігом процесу при нормальній температурі без утворення токсичних проміжних сполук.

Питання до самоперевірки

1. Біоенергетика. Біотехнологічне виробництво етилового спирту.
2. Біотехнологічне виробництво біогазу з нетрадиційної сировини.
3. Біотехнологічне виробництво вуглеводнів. Фотовиробництво водню та перетворення енергії сонячного світла.

ЛІТЕРАТУРА

Основна

1. *Бекер М.Е., Лиепиньш Г.К., Райпулис Е.П.* Биотехнология. – М.: Агропромиздат, 1990. – 334 с.
2. *Ждан-Пушкина С.М.* Основы роста культур микроорганизмов. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1983. – 188 с.
3. *Ленинджер А.* Основы биохимии: В 3-х т.– М.: Мир, 1985. – Т.2. 368 с.
4. *Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко Б.О.* Основи біотехнології рослин: Підручник. – К.: Вища шк., 2000 . – 248 с.
5. *Небел Б.* Наука об окружающей бреде: Как устроен мир: В 2-х т. – Т.2: Пер. с англ. – М.: Мир, 1993. – 336 с.
6. *Никитин Г.А.* Метановое брожение в биотехнологии. – К.: Выща шк., 1990. – 207 с.
7. *Сассон А.* Биотехнология: свершения и надежды. – М.: Мир, 1987. – 411 с.
8. *Сельскохозяйственная биотехнология: Учебник / В.С.Шевелуха, Е.А.Калашникова, Е.С.Воронин и др.* – М.: Высш. шк., 2003. – 469 с.
9. *Экологическая биотехнология: Пер. с англ. / Под. ред. К.Ф. Форстера, Д.А.Дж. Вейза.* – Л.: Химия, 1990. – 384 с.

Додаткова

10. *Бейли Дж., Оллис Д.* Основы биохимической инженерии. – Ч.2. – М.: Мир, 1989. – 590 с.
11. *Варфоломеев С.Д., Калюжный С.В.* Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов. – М.: Высш. шк., 1990. – 296 с.
12. *Глазко В.И., Глазко Г.В.* Руссо-англо-украинский толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике. – К.: Нора-принт, 2000. – 464 с.

13. *Голубовская Э.К.* Биологические основы очистки воды. – М.: Высш. шк., 1978. – 271 с.
14. *Грин Н., Стаут У., Тейлор Д.* Биология: В 3-х т. – Т. 2.– М.: Мир, 1989. – 325 с.
15. *Кретович В.Л.* Биохимия растений. – М.: Высш. шк., 1986. – 503 с.
16. *Манаков М.Н., Победимский Д.Г.* Теоретические основы микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1990. – 272 с.
17. *Яковлев С.В., Ласков Ю.М.* Канализация. – М.: Стройиздат, 1987. – 319 с.

ЗМІСТ

1. Екологічна ситуація та роль біотехнології в її покращанні	3
2. Біохімічні основи екологічної біотехнології. Анаболізм та катаболізм – основні процеси метаболізму.....	6
3. Розклад речовин в аеробних умовах.....	7
4. Розклад речовин в анаеробних умовах.....	8
5. Проблема розкладу складних субстратів у екологічній біотехнології.....	10
6. Мікробіологічні аспекти екологічної біотехнології.....	13
7. Технологічні аспекти екологічної біотехнології. Особливості культивування мікроорганізмів.....	15
8. Особливості культивування клітин рослин і тварин.....	19
9. Практичні напрями екологічної біотехнології. Очищення стічних вод.....	24
10. Тверді відходи.....	29
11. Імобілізація клітин.....	32
12. Біотехнологічні альтернативи у сільському господарстві.....	35
13. Екологічна біотехнологія – основа енергетики майбутнього.....	39
ЛІТЕРАТУРА.....	43

Навчальне видання

ЕКОЛОГІЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ

з дисципліни

для студентів спеціальності 6.070800 „Екологія

та охорона навколишнього середовища”

напряму 0708 “Екологія”

денної форми навчання

Укладач: Бублієнко Наталія Олександрівна

Редактор В.П.Оровецька

Комп'ютерна верстка

Підп. до друку 00.00.05 р. Обл.–вид. арк. Наклад пр. Вид.
№ Зам. №

РВЦ НУХТ 01033 Київ–33, вул. Володимирська, 68

[www. book. nuft. edu. ua](http://www.book.nuft.edu.ua)

Свідоцтво про реєстрацію серія ДК № 1786 від 18.05.04 р.