



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 92938

(13) C2

(51) МПК-2011.01
G01N 7/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ БІОХІМІЧНОГО ПРОЦЕСУ

1

(21) а200812869

(22) 04.11.2008

(24) 27.12.2010

(46) 27.12.2010, Бюл.№ 24, 2010 р.

(72) ГВОЗДЯК ПЕТРО ІЛЛІЧ, САПУРА ОЛЕНА ВА-
СИЛІВНА, ГЛОБА ЛЕОНІД ІВАНОВИЧ(73) ІНСТИТУТ КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ ТА ХІМІЇ ВОДИ
ІМ. А.В. ДУМАНСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕ-
МІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) EP 0340902 A1, 08.11.1989.

US 4152213, 01.05.1979.

US 5047331, 10.09.1991.

US 4270381, 02.06.1981.

RU 99108700 A, 10.02.2001.

Пирог Т.П. Загальна мікробіологія.-К.:НУХТ, 2004.-
С.333-339.Векірчик К.М. Практикум з мікробіології.-К. Либідь,
2003.-С.97-100.

2

Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по
микробиологии пищевых производств.- М.: Легкая
и пищевая промышленность, 1984.-С.98.(57) 1. Спосіб визначення інтенсивності біохімічно-
го процесу, що включає протікання вказаного про-
цесу в герметичному об'ємі культурального сере-
довища, розміщеного в ємності, який
відрізняється тим, що як ємність використовують
пластичну ємність і біохімічний процес починають,
попередньо стиснувши ємність у відкритому стані,
зафіксувавши об'єм культурального середовища
та загерметизувавши ємність, а інтенсивність про-
цесу визначають за швидкістю відновлення пусто-
го об'єму ємності.2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як
ємність використовують ПЕТ-пляшку.

Винахід відноситься до області аналізу мате-
ріалів шляхом визначення їх фізико-хімічних влас-
тивостей, зокрема, шляхом вимірювання об'єму
газу, що виділяється із матеріалу, і може бути ви-
користаний при дослідженні біохімічних процесів.

Велика кількість біохімічних процесів супро-
джується виділенням газів (бродиння, денітрифіка-
ція, утворення сірководню, тощо) (Пирог Т.П. Зага-
льна мікробіологія. - К.: НУХТ, 2004. - 333с.) [1].
При дослідженні таких процесів виникає необхід-
ність вимірювати інтенсивність газоутворення, щоб
за отриманими даними побудувати графіки залеж-
ності об'єму газу, що утворився, від того чи іншого
фізіолого-біохімічного процесу досліджуваного
мікробного об'єкту (приросту біомаси, швидкості
споживання субстрату тощо). При діагностуванні
природного матеріалу на наявність мікроорганізмів
здатних до газоутворення (виявлення денітрифіка-
торів, сульфатредукторів, метаноутворювальних
бактерій тощо), також необхідно спостерігати за
об'ємом газів, які виділяються.

Відомий спосіб вивчення біохімічних процесів,
наприклад, процесу спиртового бродиння, за нако-
пиченням газів, що виділяються (Векірчик К.М.
Практикум з мікробіології. - К. Либідь, 2003 - с. 97)
[2].

Суть способу [2] полягає в наступному. Дослі-
дження проводять на установці, яка складається з
конічної колби об'ємом 250 см³, закритої гумовою
пробкою, в яку вставлена газовідвідна трубка, зов-
нішній кінець якої занурений у посудину з водою.
Для збирання газу зовнішній кінець трубки з'єдну-
ють з пробіркою, розміщеною в посудині.

Для проведення дослідження процесу у коніч-
ну колбу, описаної вище установці, вносять куль-
туральне середовище, що містить 3-5 г пресова-
них дріжджів (мікробний матеріал) і наливають
100см³ 15%-ного розчину сахарози (поживне се-
редовище) і закривають пробкою з газовідвідною
трубкою, зовнішній кінець якої занурюють у посуд-
ину з водою і з'єднують з пробіркою для збирання
вуглекислого газу. Загальну кількість газу, що ви-
ділився внаслідок проходження біохімічного про-
цесу, визначають за допомогою зважування дослі-
дної установці з культуральною рідиною, яке
проводять відразу коли був поставлений дослід, і
по його закінченню. Виявлена при цьому різниця
вказує на кількість вуглекислого газу, що утворив-
ся.

Кількість вуглекислого газу, що виділилась за-
лежить від кількості вихідного мікробного матеріа-
лу (дріжджів) та сахарози в поживному середови-

(13) C2

(11) 92938

(19) UA

щі. А інтенсивність проходження біохімічного процесу залежить, у свою чергу, від швидкості виділення CO_2 . При цьому даний спосіб передбачає визначення інтенсивності біохімічного процесу (бродиння) за кількістю CO_2 , який виділився по закінченню бродиння.

Таким чином, відомий спосіб [2] не передбачає визначення інтенсивності біохімічних процесів за швидкістю виділення газу, що утворюється в процесі бродиння. Крім того, слід відмітити, складність самої установки та ненадійність дотримання герметичності.

Найбільш близьким аналогом до винаходу за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб визначення інтенсивності процесу бродиння (Т.П. Слюсаренко. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984 - с. 98) [3].

Суть способу [3] полягає в наступному. Дослідження проводять на установці, яка складається з конічної колби об'ємом 250 або 300 см^3 , закритої гумовою пробкою, в яку вставлений затвор. В середину затвору залита концентрована сірчана кислота, яка пропускає вуглекислий газ, що виділяється при бродинні, і затримує пари води і спирту. Для повної герметичності гумова пробка заливається парафіном.

Дослід проводять наступним чином. Готують синтетичне поживне середовище (наприклад середовище Рідерна) такого складу, (%об'ємні): Сахароза - 15,0, Пептон - 0,5, KH_2PO_4 - 0,3, MgSO_4 - 0,1.

Потім 150 см^3 приготовленого поживного середовища заливають у колбу ємністю 250 см^3 . Також у цю ж саму колбу вносять 25 см^3 заздалегідь приготовленого мікробного матеріалу, який являє собою дріжджову суспензію, (об'єм мікробної культури (дріжджів), у суспензії варіюється від 1-1,5 до 8-10% (об'ємних)). Потім колбу закривають гумовою пробкою із вставленим затвором, заповненим концентрованою сірчаною кислотою, для виходу вуглекислого газу.

Біохімічний процес в культуральному середовищі вказаного складу проводять при температурі 28-30°C протягом трьох діб. При цьому інтенсивність біохімічного процесу визначають за кількістю CO_2 , що виділяється під час бродиння. Кількість CO_2 визначають за допомогою зважування дослідної установки на технічних терезах з точністю до 0,01 г. Зважування проводять відразу після того, як у колбу дослідної установки було залито культуральну рідину і створено герметичність, а потім його повторюють через 4, 8, 12, 24, 36, 48 і 72 години. Тобто, на скільки грамів зменшилась вага установки, стільки грамів CO_2 виділилось назовні. За отриманими результатами складають відповідні таблиці і будують графіки залежності виділення вуглекислого газу від часу, тобто визначають інтенсивність біохімічного процесу.

Недоліками даного способу визначення інтенсивності біохімічних процесів є досить тривалий час підготовки досліду, а також те, що при протіканні біохімічного процесу не передбачено збирання утворених газів для подальшого їх дослідження, (встановлення їх складу, тощо), та

складність і ненадійність експлуатації дослідної установки (ємності, з яких складається дана установка виготовлені зі скла).

В основу винаходу поставлено завдання удосконалити спосіб визначення інтенсивності біохімічного процесу, використовуючи герметичні ємності з пластичного матеріалу та забезпечуючи збирання газу, що утворюється в біохімічному процесі. Все вказане вище забезпечує скорочення часу на підготовку досліду, підвищення надійності експлуатації установки та її спрощення, а також розширення функціональних можливостей за рахунок вимірювання об'єму газу в процесі його утворення та його збирання, визначення його складу та встановлення природи мікробного об'єкту.

Для вирішення поставленої задачі запропоновано спосіб визначення інтенсивності біохімічного процесу, що включає протікання вказаного процесу в герметичному об'ємі культурального середовища, розміщеного в ємності, в якому, згідно з винаходом, як ємність використовують пластичну ємність і біохімічний процес починають, попередньо стиснувши ємність у відкритому стані, зафіксувавши об'єм культурального середовища та загерметизувавши ємність, а інтенсивність процесу визначають за швидкістю відновлення пустого об'єму ємності; причому, як ємність використовують ПЕТ-пляшку.

Використання ємності з пластичного матеріалу дозволяє створити анаеробні умови, витискаючи культуральною рідиною, при стисканні ПЕТ-пляшки, весь об'єм повітря, після чого пляшку щільно загвинчують пластмасовою кришкою. Тобто, досягається герметичність ємності, а градування ємності і її герметичність дозволяють з високою точністю і надійно вимірювати об'єм газу, що утворюється. Причому, об'єм газу вимірюється періодично при протіканні біохімічного процесу. За величиною об'єму газу, що виділяється за певний проміжок часу (швидкість утворення CO_2), протягом всього процесу визначають інтенсивність біохімічного процесу в цілому. Аналіз виділеного газу дає можливість визначити наявність у мікробному матеріалі природу тих мікроорганізмів, які зумовлюють утворення даного газу.

Таким чином, сукупність суттєвих ознак способу, що заявляється, є необхідною і достатньою для досягнення забезпечуваного винаходом технічного результату - спрощення та підвищення надійності експлуатації дослідної установки, скорочення часу підготовки досліду, також розширення функціональних можливостей способу, завдяки визначенню природи мікробного матеріалу.

Спосіб реалізується наступним чином.

Визначення інтенсивності біохімічних процесів здійснювали за допомогою герметичної ємності, в якості якої використовували ПЕТ-пляшки, виготовлені з м'якого прозорого пластика промисловим способом. Герметичність даної пляшки досягається за рахунок нагвинчування пластмасової кришки. Градування об'єму здійснюють, заливаючи певний об'єм рідини та наносячи зверху до низу відповідні поділки.

В ємність поміщають культуральне середовище, яка містить поживне середовище та мікробний

матеріал, не заповнюючи при цьому весь об'єм пляшки. В якості поживного середовища використовували рідке мінеральне середовище складу 1 (KH_2PO_4 ; NaHCO_3 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та NaNO_2) 2 (розчин сахарози), а в якості мікробного матеріалу - 1(активний мул, відібраний з очисних споруд Бор-тницької станції аерації), 2(дріжджова суспензія). Стискають пляшку таким чином, щоб культуральна рідина піднялась до верхньої межі горловини пляшки і герметично закривають кришкою.

Після герметизації ємність деформується під дією створеного вакуумного середовища. При протіканні біохімічного процесу, газ, що виділяється, заповнює об'єм пляшки зверху до низу і за позначками визначають об'єм газу, що утворився за певний проміжок часу.

На основі отриманих даних були побудовані графіки залежності об'єму газу, що утворився, за певний проміжок часу, де на Фіг.1 представлена крива швидкості виділення газу при протіканні біохімічного процесу в активному мулі, а на Фіг.2 - крива швидкості виділення газу в процесі спиртового бродіння.

Після закінчення біохімічного процесу для визначення хімічного складу газу, що утворився, за допомогою шприца його відбирають на аналіз. Якщо відібраний газ являє собою сірководень, це свідчить про наявність у досліджуваному мікробному матеріалі сульфатредукторів, якщо газом являється метан - в мікробному матеріалі присутні метаноутворюючі бактерії, а якщо азот - то це вказує на наявність денітрифікаторів або ANAMMOX-бактерій, в залежності від складу поживного середовища.

Приклади виконання за винаходом

Приклад I

Беруть заздалегідь проградуйовану зверху до низу ПЕТ-пляшку ємністю 500 см^3 (дослідна установка), в яку поміщають 350 см^3 рідкого мінерального поживного середовища наступного складу (мг/см^3): KH_2PO_4 - 700, NaHCO_3 - 1400, $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 471, NaNO_2 - 247, та вносять 50 см^3 активного мулу. Потім пляшку стискають таким чином, щоб культуральне середовище (поживне середовище і активний мул) піднялось до верхньої межі горловини пляшки. Після цього фіксують об'єм і створюють герметичність, нагвинчуючи пластмасову кришку.

В ході протікання анаеробного біохімічного процесу ведуть моніторинг за виділенням газу. Виділений газ поступово заповнює пустий об'єм пляшки зверху до низу. Внаслідок чого, деформована в результаті створеного вакууму пластикова ємність починає відновлювати свій об'єм.

Об'єм утвореного газу визначають за нанесеними на пластикovu ємність позначками. Вимірювання проводять протягом 282 годин (11 діб) через кожні 24 години (результати спостережень занесені до таблиці (графи 1, 2).

Залежність виділення утвореного газу (см^3) від часу (годин) графічно зображено на Фіг.1.

Одержана крива характеризує швидкість протікання біохімічного процесу:

- відрізок часу, що становить 48 годин, відповідає лаг-фазі (період адаптації мікробного матеріалу до умов культивування);

- відрізок часу, що складає 186 годин (від 48 до 234 години) - відповідає експоненційній фазі (період максимальної швидкості поділу клітин).

- Після цього спостерігається період сповільненого росту.

Таким чином, даний біохімічний процес проходить з низькою інтенсивністю.

Потім проводять аналіз газу, що утворився при протіканні біохімічного процесу, відібравши 50 см^3 даного газу шприцом, і ввівши його в газоаналізатор.

80% утвореного газу являє собою азот, що свідчить про наявність в мікробному матеріалі ANAMMOX-бактерій. Використання цих мікроорганізмів дає можливість очищати стічні води від амонійного азоту в анаеробних умовах.

Приклад II

У проградуйовану зверху до низу ПЕТ-пляшку ємністю 500 см^3 (дослідна установка) поміщають 250 см^3 15%-ного розчину сахарози підігрітого до 29°C , та 50 см^3 приготовленої дріжджової суспензії (вміст дріжджів у суспензії становить 1г). Потім створюють герметичність та фіксують об'єм аналогічно прикладу 1.

Після цього дослідну установку ставлять у термостат, встановлюючи температуру 30°C . Спостереження за ходом анаеробного біохімічного процесу проводять за швидкістю виділення вуглекислого газу. Вимірювання - проводять протягом 72 годин (3 доби) через кожні 4 години (результати спостережень занесені до таблиці (графи 3, 4)

Залежність виділення вуглекислого газу (см^3) від часу (годин) графічно зображено на Фіг.2.

Як видно з Фіг.2, процес спиртового бродіння проходить досить інтенсивно:

- відрізок часу, що становить 1,5 години, відповідає лаг-фазі;

- відрізок часу, що складає 50,5 годин (від 1,5 до 52 години) - відповідає експоненційній фазі (період максимальної швидкості поділу клітин).

- Після цього спостерігається період сповільненого росту.

Таблиця

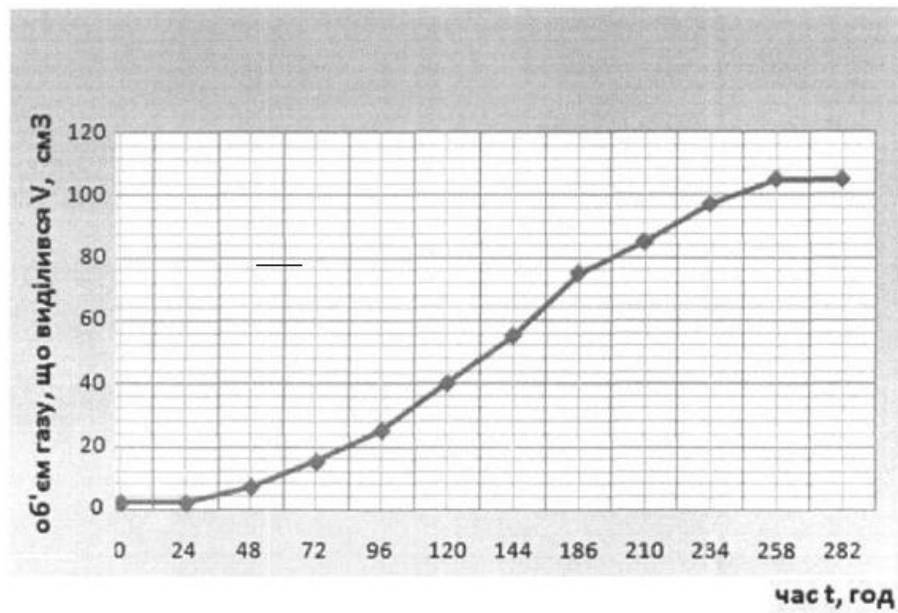
Приклад I		Приклад II	
1	2	3	4
Час, години	Об'єм, см ³	Час, години	Об'єм, см ³
0	0	0	0
24	1	4	15
48	5	8	30
72	12	12	50
96	20	16	70
120	37	20	90
144	50	24	110
186	70	28	125
210	82	32	140
234	95	36	150
258	100	40	157
282	100	44	165
		48	170
		52	180
		56	182

		60	185
		64	187
		68	190
		72	190

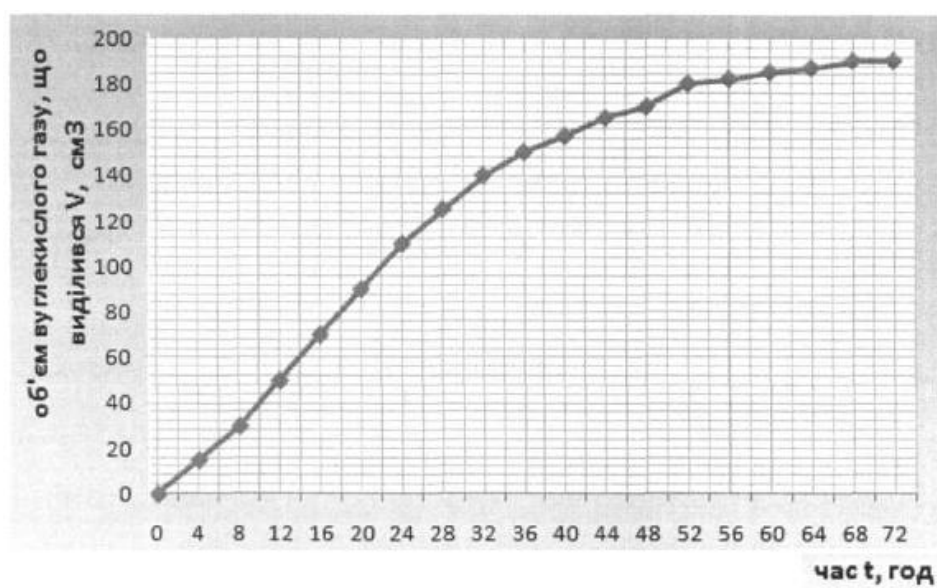
Запропонований спосіб визначення інтенсивності біохімічного процесу в порівнянні з відомим способом [3] полягає в наступному. Реалізація способу, що заявляється забезпечує:

- Підвищення надійності експлуатації дослідної установки, її спрощення та скорочення часу підготовки дослідів за рахунок використання герметичних пластичних ємностей;

- Розширення функціональних можливостей завдяки збиранню газу, що виділяється в герметичній ємності, що дозволяє визначати склад утвореного газу, що в свою чергу дасть можливість визначити природу мікробного об'єкту, внаслідок життєдіяльності мікроорганізмів, які у ньому містяться і продукують виділення даного газу.



Фіг. 1



Фіг. 2