МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«ДНІПРОВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
Кафедра екології та технологій захисту навколишнього середовища

О.І. Сідашенко, В.В. Федотов

ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт
для здобувачів ступеня бакалавра
освітньо-професійної програми «Біологія»
зі спеціальності 091 (Е1) Біологія та біохімія

Дніпро
НТУ «ДП»
2025

Сідашенко О.І.

Основи біотехнології [Електронний ресурс] : методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для здобувачів ступеня бакалавра освітньо-професійної програми «Біологія» зі спеціальності 091 (Е1) Біологія та біохімія / О.І. Сідашенко, В.В. Федотов ; М-во освіти і науки України, НТУ «Дніпровська політехніка». – Дніпро : НТУ «ДП», 2025. – 58 с.

Автори:
О.І. Сідашенко, канд. біол. наук, доц.,
В.В. Федотов.

Затверджено науково-методичною комісією зі спеціальності Е1 Біологія та біохімія (протокол № 5 від 27.11.2025 р.) за поданням кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища (протокол № 5 від 15.12.2025 р.).

Уміщено теоретичні відомості за темами лекційного курсу, тему і мету лабораторних занять, визначено завдання та порядок їх виконання, наведено контрольні питання, список використаної та рекомендованої літератури.

Орієнтовано на активізацію навчальної діяльності здобувачів ступеня бакалавра спеціальності 091 (Е1) Біологія та біохімія та закріплення практичних навичок у засвоєнні дисципліни «Основи біотехнології».

Відповідальна за випуск завідувачка кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища О.О. Борисовська, канд. техн. наук, доц.

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Основи біотехнології — це навчальна дисципліна, що вивчає застосування різних біологічних об’єктів та їх процесів у різних галузях сучасного світу з метою отримання цінних продуктів.

Біотехнологія є одним із передових напрямків сучасної науки та промисловості. Біотехнологічні розробки активно застосовуються у медичній та сільськогосподарській галузях, а також відіграють велику роль в отриманні «зеленої» енергетики та у захисті навколишнього середовища.

Мета дисципліни – формування у здобувачів теоретичних знань та практичних навичок різних напрямків біотехнологічної галузі, створенні основи для вирішення харчових, медичних та природоохоронних задач шляхом застосування сучасних біотехнологій; обґрунтуванні новітніх розробок біотехнології у захисті об’єктів навколишнього середовища.

Лабораторні роботи описані за єдиною схемою: назва теми лабораторного заняття, мета, теоретична та практична частини, контрольні питання.

Виконання лабораторних робіт спрямовано на досягнення таких дисциплінарних результатів навчання:

- Знати основні терміни, теорії, концепції, закони у галузі біології та споріднених наук і вміти їх застосовувати;
- Знати та розуміти вплив фізичних факторів, неорганічних і органічних речовин на живі організми різних рівнів організації: бактерії, гриби, віруси, культури клітин тканин тварин або рослин та навколишнє середовище;
- Знати та розуміти особливості різних біологічних продуцентів;
- Застосовувати основні процеси, що відбуваються у клітині;
- Застосовувати основні закони генетики, генно-інженерні та селекційні методи для вирішення біотехнологічних завдань;
- Знати, розуміти та визначати основні параметри біотехнології і вміти їх застосовувати для вирішення природоохоронних задач; обґрунтовувати та використовувати біотехнології для захисту об’єктів довкілля;
- Знати біологічні продуценти, які використовуються у біотехнології та розуміти їх особливості. Оволодіти основними методами та способами культивування біотехнологічних об'єктів;
- Знати організацію біотехнологічної лабораторії та джерела контамінації, шляхи їх усунення. Розуміти значення асептики та стерильності на біотехнологічних виробництвах;
- Розуміти роль біооб'єктів у охороні навколишнього середовища, застосовувати мікроорганізми різних родів та видів з метою біологічної очистки води, ґрунту та газоподібних відходів, проводити санітарний контроль мікробіологічних показників води, повітря і ґрунту;

- Застосовувати біоінсектицидні препарати для захисту сільськогосподарських рослин, використовувати біодобрива, стимулятори/регулятори росту тощо та знати їх склад і вплив на живі організми;
- Застосовувати біотехнології з метою переробки твердих органічних відходів різного походження шляхом біотрансформації, біоконверсії, вермикультивування тощо;
- Застосовувати різні продукти біотехнології у ветеринарії: про-, пре- та синбіотики, гормони росту, антибіотики, фагові препарати тощо, розуміти технологію їх отримання, склад і вплив на живі організми;
- Знати та розуміти застосування біотехнологій у альтернативній енергетиці з метою отримання біогазу шляхом метанового бродіння, а також одержання біодизелю, біоетанолу тощо;
- Знати та розуміти застосування біотехнологій у сучасній медико-фармацевтичній галузі та харчовій промисловості.

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У ЛАБОРАТОРІЇ

Загальні правила роботи у лабораторії

1. У лабораторії має бути ідеальна чистота.
2. Забороняється входити у верхньому одязі та класти на робочі столи сторонні предмети (сумки та інші особисті речі).
3. У лабораторії дозволяється працювати лише у спеціальному одязі – халатах, що захищає та попереджує розповсюдження біооб'єктів поза лабораторним приміщенням і захищає від дії різних хімічних речовин. Додатково (за необхідністю) – мають бути рукавички, маска для обличчя, захисні окуляри.
4. Чітко виконувати інструкції до лабораторних занять. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки інструментами.
5. На робочому місці підтримувати чистоту та охайність.
6. Дотримуватись правил особистої гігієни та профілактики.
7. Не можна виносити за межі лабораторії/кафедри будь-які матеріали (пробірки, фарби, реактиви та ін.).
8. ***УВАГА!!!*** У лабораторії забороняється вживати їжу, пити воду, тощо.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

«ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У БІОТЕХНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ. ЛАБОРАТОРНИЙ ПОСУД ТА УСТАТКУВАННЯ»

Мета роботи: ознайомитися з правилами техніки безпеки при роботі у біотехнологічної лабораторії, лабораторним посудом та основним обладнанням.

***Матеріали та обладнання*:** мікроскопи та інше лабораторне обладнання, лабораторний посуд: пробірки, піпетки, чашки Петрі, колби, шпателя, мікробіологічні петлі тощо.

✓ У результаті виконання лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

✓ Знати, розуміти та визначати основні параметри біотехнології і вміти їх застосовувати для вирішення природоохоронних задач; обґрунтовувати та використовувати біотехнології для захисту об'єктів довкілля;

✓ Знати організацію біотехнологічної лабораторії та джерела контамінації, шляхи їх усунення. Розуміти значення асептики та стерильності на біотехнологічних виробництвах.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії

1. Лабораторні роботи необхідно виконувати у спецодягу (халаті), захищаючи одяг та шкіру від потрапляння на них хімічних реактивів та культур мікроорганізмів.
2. Кожний студент має працювати на закріпленому за ним робочому місці.
3. Робоче місце слід підтримувати у чистоті, бути охайним.
4. Забороняється виконувати лабораторні роботи за відсутності викладача або лаборанта.
5. До виконання кожної роботи студенти можуть приступити тільки після отримання інструктажу з техніки безпеки та дозволу викладача.
6. Перед початком виконання лабораторної роботи, необхідно ознайомитися з методами та етапами проведення дослідження, правилами безпечного виконання.
7. Експериментальну роботу потрібно виконувати чітко за її описом у методичних рекомендаціях, особливо дотримуватися черги додавання реактивів.
8. Під час проведення біотехнологічних робіт потрібно використовувати лише чистий та сухий, за потреби – стерильний лабораторний посуд; для кожного реактиву потрібно мати мірний посуд (піпетку, бюретку, мензурку, мірний циліндр тощо).
9. Якщо у ході проведення експерименту потрібне нагрівання реакційної суміші, то треба дотримуватися передбаченого способу нагрівання: на водяній бані, на електроплитці та ін.

10. Пролиті на підлогу та стіл хімічні речовини або культури мікроорганізмів знешкодити та видалити під керівництвом лаборанта (викладача) відповідно до правил.

11. Бути акуратним, уважним та спостережливим.

12. Після закінчення роботи потрібно помити посуд, протерти поверхню стола, закрити водопровідні крани, виключити електричні прилади.

Правила техніки безпеки при роботі з біооб`єктами

1. У лабораторії забороняється приймати їжу, пити воду.

2. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки за допомогою спеціальних інструментів: мікробіологічної петлі, шпателя тощо

3. При випадковому потраплянні біологічного матеріалу (особливо мікроорганізмів) на стіл, руки, потрібно провести обробку дезінфекційним розчином.

4. Після закінчення проведення роботи ретельно вимити руки з використанням дезінфекційних засобів.

5. **Увага!** Працювати з культурами мікроорганізмів потрібно з дотриманням умов стерильності.

Лабораторний посуд

Всі роботи у лабораторіях здійснюють з використанням різного хімічного посуду або приладів. Набір посуду (скляного, фарфорового або з пластмас) залежить від характеру роботи, що проводиться. Скляний хімічний посуд розділяється на три основних групи:

- ✓ посуд загального призначення;
- ✓ посуд спеціального призначення;
- ✓ мірний посуд.

До *посуду загального призначення* відносяться: пробірки, хімічні лійки та склянки, плоскодонні (круглі) колби, конічні колби, крапельниці, скляні холодильники і т.п.

Посуд спеціального призначення застосовується, наприклад, при роботі з мікроорганізмами, синтезі органічних та неорганічних сполук тощо. До нього відносяться, чашки Петрі, качалочні колба, імунологічні планшети, фарфорові ступки з товкачиком та ін. (рис. 1.1).

А Б

Рис. 1.1. Лабораторний посуд:
А – загального призначення; Б – спеціального призначення

Мірний посуд застосовується для відмірювання різних об`ємів рідин: мірні циліндри, піпетки, бюретки, мірні колби та склянки.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Завдання 1. Запишіть у зошит для лабораторних робіт правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії.

- Наведіть структурну організацію біотехнологічної лабораторії. Вкажіть приміщення, які входять до її складу.
- Що таке автоклавна або стерилізаційна кімната?
- Що таке віварій? Які особливості його обладнання?
- Що таке качалочна та термостатні кімнати? З якою метою їх застосовують?

Завдання 2. Надайте інформацію з малюнками про усі види лабораторного посуду, що були розглянуті на лабораторній роботі.

Дайте відповіді на питання:

- Який посуд застосовують при проведенні мікробіологічних досліджень?
- Який посуд потрібен для мікроклонального розмноження рослин?
- Подумайте: який посуд застосовують для отримання кисломолочних продуктів?
- Наведіть приклади лабораторного посуду для одно- та багаторазового використання. Яка між ними різниця?

Завдання 3. Що таке бокси у лабораторіях, для чого їх використовують? Наведіть особливості роботи у боксах. Опишіть правила роботи у ламінар-боксі.

Контрольні питання:

1. Назвіть види лабораторного посуду.
2. Який посуд відноситься до загального, а який має спеціальне призначення?
3. Який посуд застосовують у біотехнологічній лабораторії?
4. Які правила роботи з мікроорганізмами?
5. Назвіть особливості устаткування біотехнологічної лабораторії.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

«ОСНОВНІ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА ТА РІЗНОВИДИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ»

Мета роботи: засвоїти етапи та ознайомитися з найпоширенішими схемами біотехнологічного виробництва і продуктами біотехнології

Матеріали та обладнання*:* культура дріжджів *Saccharomyces cerevisiae,* предметні та покривні скельця, барвник метиленовий синій, фільтрувальний папір, мікроскоп, презентація.

У результаті виконання лабораторної роботи будуть сформовані **наступні результати навчання:**

- ✓ Знати та розуміти особливості різних біологічних продуцентів;
- ✓ Знати біологічні продуценти, які використовуються у біотехнології та розуміти їх особливості. Оволодіти основними методами та способами культивування біотехнологічних об'єктів.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Біотехнологічний процес – це виробничий процес, у якому використовується життєдіяльність організмів або продукти їх метаболізму. Біотехнологічний процес включає три основні стадії:

1 – підготовчу (підготовка біологічного об’єкту);

2 – культивування біооб’єкту;

3 – відділення, очищення та модифікація цільового продукту.

Біотехнологічні продукти – це речовини, що утворюються у результаті життєдіяльності живих клітин, тканин біооб’єктів у штучних умовах. Найбільш поширена *біотехнологічна продукція* — це біологічно активні речовини (вітаміни, ферменти, гормони, амінокислоти, білки, вуглеводи, нуклеотиди, антибіотики, стероїди, імуноглобуліни, алкалоїди, пестициди та ін.), продукти бродіння (спирти, органічні кислоти, квас, вино тощо), енергетичні речовини (біогаз, етанол, водень), рідкі метали (біометалургія), речовини харчового (глюкозо-фруктозний сироп) та кормового призначення (кормові дріжджі), продукти на основі технології культури клітин – вакцини, компоненти крові, моноклональні антитіла. Приклади біотехнологічних продуктів наведено на рисунку 2.1.

Основою сучасних біотехнологічних виробництв є *мікробіологічний синтез*. Об’єкти рослинного та тваринного походження знаходять менш

широке використання, ніж мікроорганізми, завдяки високим вимогам до умов культивування (значне подорожчання виробничих процесів).

Характерна особливість мікроорганізмів – їх здатність до надсинтезу, тобто надлишковому утворенню деяких продуктів обміну речовин (багатьох амінокислот, нуклеотидів, вітамінів), які перевищують потреби мікробної клітини.

А

Б

В

Г

Д Е

Рис. 2.1. Продукти біотехнологічної галузі:
А – хлібопекарська галузь, Б – кисло-молочні продукти, В – лікарські фармацевтичні препарати, Г – вітаміни, Д – біогаз, Е – мікроклональне розмноження рослин

Реалізація біотехнологічного процесу здійснюється за наступною типовою схемою (рис. 2.2).

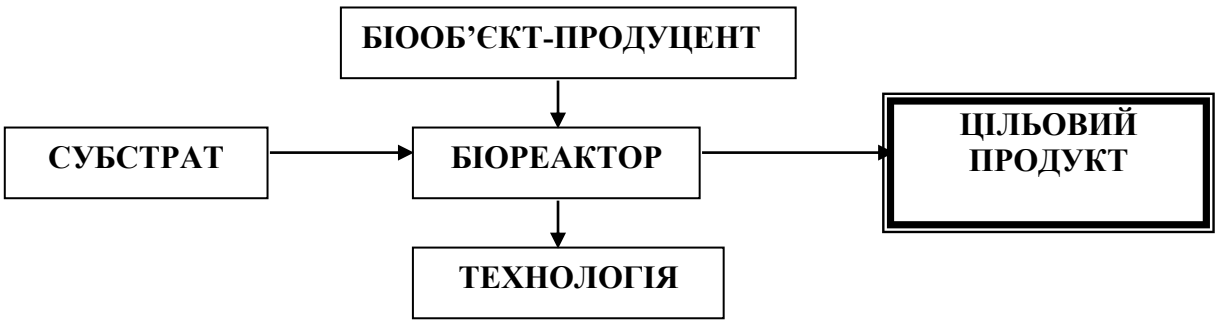


Рис. 2.2. Блок-схема біотехнологічного процесу

Біотехнологічні виробництва можуть відрізнятися біооб'єктами-продуцентами, сировиною, кількістю виробничих стадій та технологічними режимами. Однак їх можна представити однією узагальненою типовою схемою (рис. 2.3).

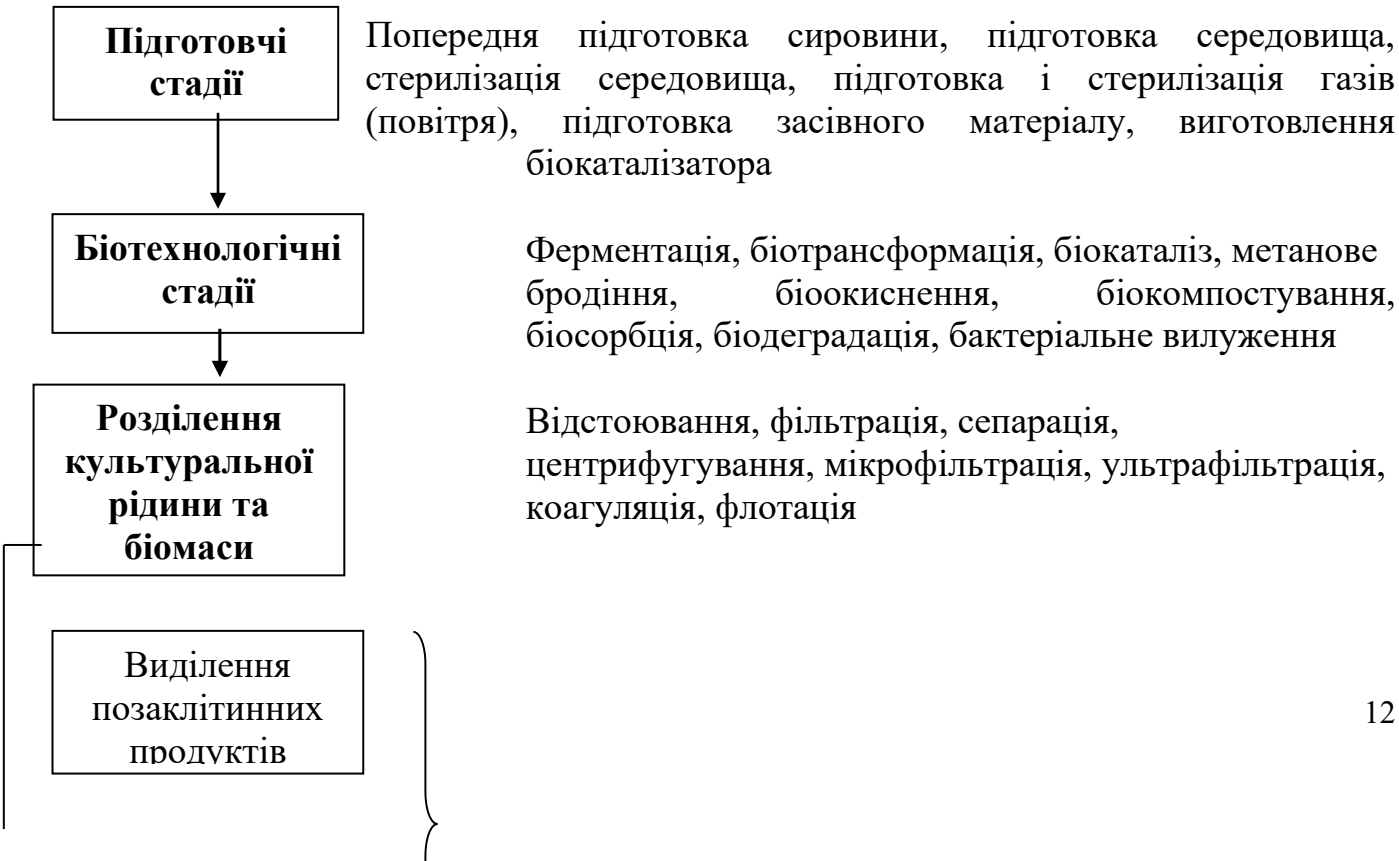
Схема включає ряд стадій, в кожній з яких сировина послідовно перетворюється через проміжні продукти у кінцевий продукт.

Основною стадією біотехнологічного виробництва є власно *біотехнологічна стадія (ферментаційна)*, на якій з використанням того або іншого біологічного об'єкту-продуценту (мікроорганізмів, ізольованих клітин, тканин, ферментів або клітинних органел), відбувається утворення цільового продукту за такими технологічними процесами:

– *ферментація* – процес, який здійснюється шляхом культивування мікроорганізмів (виробництво кефіру, йогурту шляхом молочнокислого бродіння; виробництво спирту, пива, вина – спиртовим бродінням; виробництво амінокислоти лізину, лимонної кислоти – з відходів цукрового виробництва; виробництво кормового білка шляхом нарощування дріжджової біомаси);

– *біотрансформація* – процес перетворення хімічної структури речовини під впливом ферментативної активності клітин мікроорганізмів або готових ферментів. При цьому не виникає накопичення клітин мікроорганізмів, а здійснюється хімічна модифікація речовин субстрату шляхом додавання чи віднімання радикалів, гідроксильних іонів або дегідрування (виробництво стероїдних гормонів, алкалоїдів, антибіотиків;

– *біокаталіз* – хімічне перетворення речовини, що протікає з використанням ферментів-біокаталізаторів (культивування грибів шляхом ферментативного руйнування целюлозовмісних рослинних відходів, використання біосенсорів);



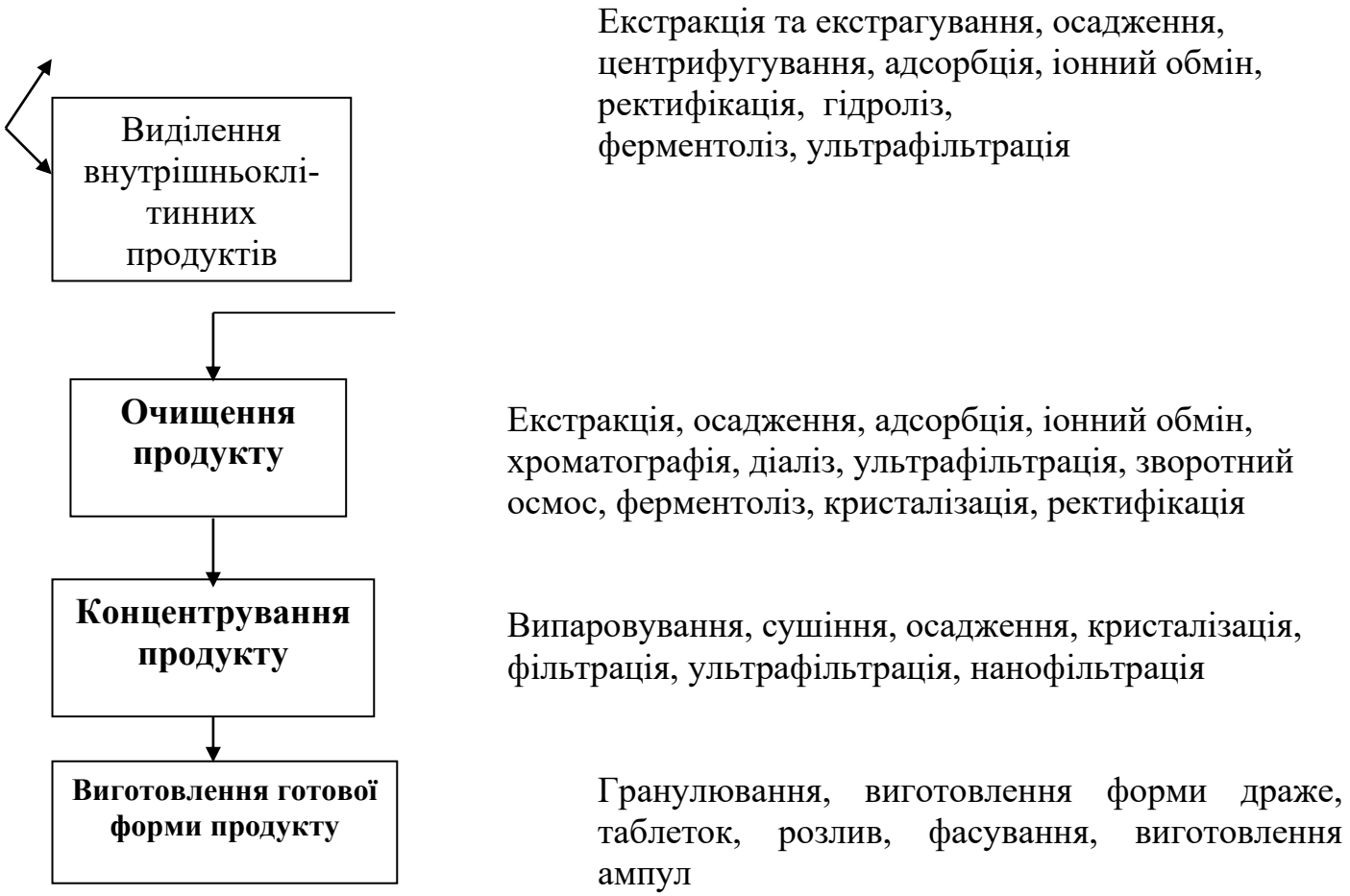


Рис. 2.3. Узагальнена схема основних стадій біотехнологічного виробництва

– *біоокиснення* – утилізація речовин-забруднювачів за участю мікроорганізмів або асоціації мікроорганізмів в аеробних умовах (початкова аеробна стадія силосування, очищення стічних вод з використанням біофільтрів);

– *метанове бродіння* – переробка органічних відходів за допомогою асоціації метанових мікроорганізмів в анаеробних умовах (виробництво біогазу з використанням органічних відходів);

– *біокомпостування* – це зниження кількості шкідливих органічних речовин у твердих відходах за допомогою асоціації мікроорганізмів (мікробне очищення ґрунту від нафтових забруднень);

– *біосорбція* – сорбція шкідливих домішок із газів або рідин мікроорганізмами, які закріплені на спеціальних твердих носіях (очищення стічних вод з використанням біофільтрів);

– *біодеградація* – руйнування шкідливих сполук під впливом мікроорганізмів-деструкторів (анаеробна стадія силосування, мікробне розкладання пестицидів);

– *бактеріальне вилуговування* – процес переведення сполук металів, що не розчиняються у воді, за допомогою мікроорганізмів у розчинний вигляд (виділення металів із руд).

Біосинтетичні можливостях біооб'єктів-продуцентів застосовують у наступним напрямках:

– віруси*:* розробка вакцин різних поколінь, імуномодуляторів та інших імунотропних препаратів, розробка діагностикумів, векторів на основі вірусів тощо;

– бактерії: антибіотики, отримання кормового білка на різних субстратах, біогазу, одержання вітамінів (B_2, B_{12}), гормонів, ферментів, органічних кислот;

– гриби: одержання амілолітичних, ліполітичних ферментів, вітамінів (β-каротину, *D*, *C*), при виготовленні сирів, кисломолочної продукції; використання дріжджів для отримання етанолу, пива, вина, харчового та кормового білка тощо;

– водорості: отримання харчових добавок, кормового білка, енергії, очищення стічної води в аеротенках та за допомогою біофільтрів;

— найпростіші: як складова частина активного мулу при очищення водоймищ та стічних вод, в якості тест-індикаторів (рис. 2.4);

– черв'яки (вермикультура): для одержання біогумусу (біодобрива), біогумату (фітогормонів), у якості білкової добавки у годівлі тварин;

– трансгенні рослини: покращення якості та підвищення продуктивності рослин за допомогою методів генної інженерії; одержання нових сортів та гібридів сільськогосподарських та інших рослин за допомогою методів селекції, використання культури ізольованих рослинних тканин для розмноження та оздоровлення садового матеріалу (методи клітинної інженерії);

Рис.2.4. Збудник американського трипаносомозу − *Trypanosoma cruzi*

– культури клітин тканин людини та тварин: виділення та перенесення диференційованих клітин на штучне живильне середовище in vitro, які

стануть продуцентами фізіологічно активних речовин - гормонів росту, мукополісахаридів, колагену, кортикостероїдів, білків, ферментів та ін.; одержання моноклональних антитіл, які синтезуються гібридомними лімфоїдними клітинами (метод клітинної інженерії), отримання вакцин та діагностика.

Якщо біооб'єктом є визначений штам мікроорганізму, то *перша стадія* (підготовча) складається з методів одержання спочатку в лабораторних умовах (в чашках Петрі або пробірках) накопичувальної культури шляхом виділення клітин мікроорганізму із невеликих проб будь-якого субстрату (ґрунту, водного середовища, мулу, повітря), а далі – чистої культури (одного виду клітин). Малі розміри мікроорганізмів дають можливість в умовах однієї пробірки одержати чисту культуру та вивчити особливості передачі спадкових ознак. Ріст колоній біопродуценту вітаміну B_2 можна розглянути на рис. 2.5.

Шляхом простого підбору важко отримати високоактивні продуценти. Тому існують методи зміни природи живого організму у заданому напрямку. *Основними методами*, які використовуються при *підборі біооб'єкту-продуценту* є методи:

1. *селекції* (спрямований відбір мутантів, тобто організмів зі зміненою спадковою інформацією – штучний відбір особин з необхідними ознаками; індукований мутагенез, відбір клонів);

2. *генної інженерії* in vivo та in vitro (введення у геном реципієнтної клітини одного або декількох чужорідних генів, або утворення в геномі нових типів регуляторних зв'язків);

3. клітинної інженерії (гібридизація соматичних клітин; одержання гібридомних клітин – метод отримання моноклональних антитіл; у рослинництві – метод клонального мікророзмноження з використанням ізольованих клітин, тканин, які бувають представленими у вигляді калусних та рідко пухлинних тканин; in vitro – метод ізольованих органів – тканинних зрізів та ін.)

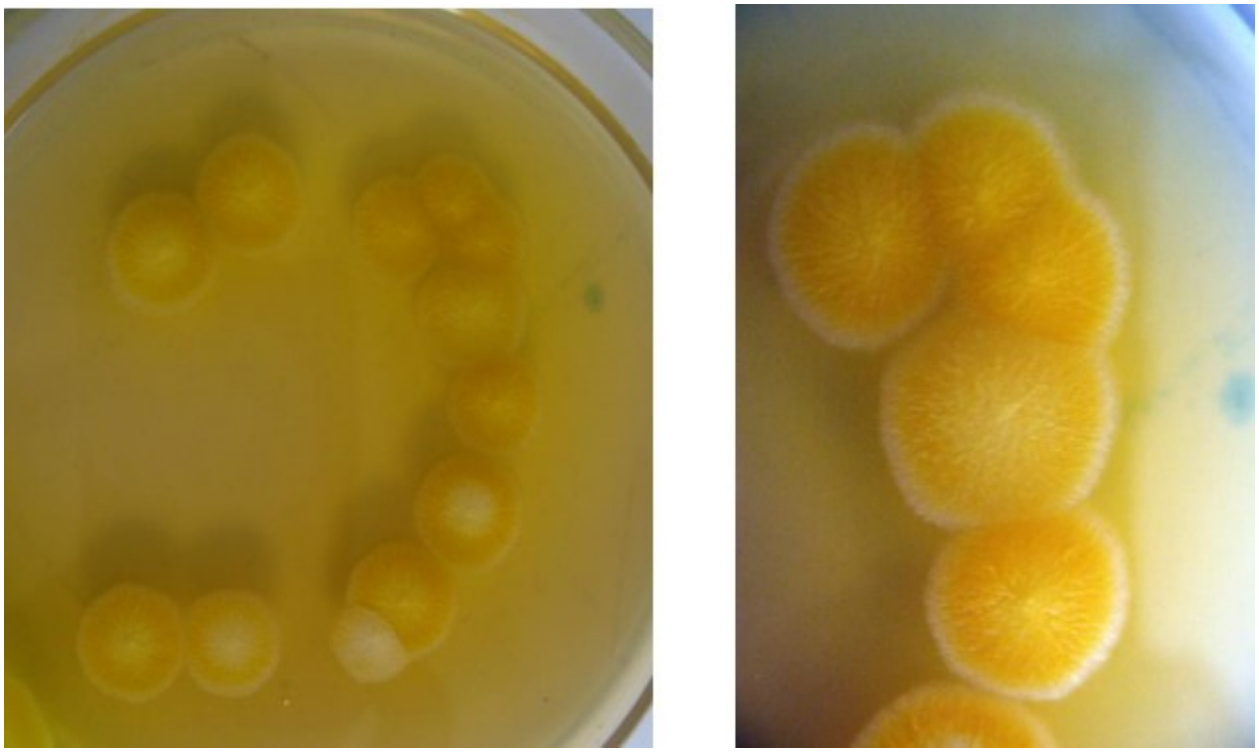


Рис. 2.5. Ріст колоній на різних середовищах

Стадія культивування мікроорганізмів у біореакторі певного типу за заданою технологією передбачає підбір субстрату для забезпечення клітин організму комплексом розчинених поживних речовин (органічних, неорганічних), які йому необхідні, і використовуються для життєдіяльності (росту і розмноження, тобто конструктивних та енергетичних процесів).

Способи постферментаційної *стадії біотехнологічного процесу* залежать від хімічної природи цільового продукту, знаходження його (у клітині або у культуральній рідині) та якщо продуктом є сама клітинна біомаса.

При культивуванні біооб'єктів у багатьох біотехнологічних процесах утворюються двофазні системи, в яких тверда фаза – маса клітин продукту біосинтезу (біомаса), а рідка – рідина з розчиненими залишками живильних речовин та продуктами біосинтезу, в якій відбувався процес культивування (культуральна рідина). Наприклад, під час метанового бродіння у метатенках утворюється, окрім біогазу, тверда та рідка зброджені фракції.

Методи відокремлення біомаси від культуральної рідини:

- сепарування та центрифугування;
- фільтрація або ультрафільтрація на мембранних фільтрах;
- осадження за допомогою флокулянтів;
- дистиляція;
- сублімація;
- випаровування, сушіння;
- ліофілізація;

- заморожування;
- осадження;
- кристалізація;
- сорбція;
- екстракція.

Важливим та відповідальним етапом кінцевої стадії є модифікація продукту та термін придатності. Модифікація – необхідний етап під час отримання ферментів, гормонів, препаратів медичного призначення. Внаслідок даного процесу відбувається зміна сполук тваринного, рослинного або мікробного походження з метою надання їм специфічних властивостей, необхідних людині.

Збереження клітин мікроорганізмів без втрати цінних якісних властивостей є можливим, якщо гальмувати їх життєво важливі процеси, у тому числі, і генетичні зміни.

Методи збереження біопродукції: ліофілізація (зневоднення під вакуумом після заморожування); висушування; збереження у вигляді спор; кріоконсервація (глибоке заморожування у рідкому азоті при –196ºС), що запобігає змінам генофонду; комбіновані методи.

Рис. 2.6. Вакуум-сушильна установка

Одним із ефективних методів збереження готової продукції, який широко застосовуються у біотехнологічному виробництві є вакуум-сушильна установка (рис. 2.6).

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Завдання 1. Надайте у зошиті для лабораторних робіт узагальнені схеми основних стадій біотехнологічного виробництва.

Наведіть блок-схеми виробництва пробіотиків, молочно-кислої продукції (йогурт, кефір, ряжанка, кисломолочний сир тощо), антибіотику, вакцини.

Уважно перегляньте блок-схеми та чітко визначте три стадії біотехнологічного процесу.

Завдання 2. Заповніть таблицю 2.1 та опишіть основні типи біотехнологічних процесів:

Таблиця 2.1 — Загальна характеристика біотехнологічних процесів

Біотехнологічний	Коротка характеристика	Приклади

процес		**впровадження біотехнологічного процесу**
Ферментація		
Біотрансформація		
Біокаталіз		
Біоокиснення		
Метанове бродіння		
Біокомпостування		
Біосорбція		
Біодеградація		
Бактеріальне вилуження		

Завдання 3. Складіть схему: **біопродуцент – продукт**.

Наприклад: *р. Lactobacillus* → *йогурт, пробіотики, квашені (ферментовані) продукти.*

Saccharomyces cerevisiae → хлібо-булочні вироби, пекарські дріжджі пресовані та ліофільно висушені, рекомбінантні вакцини.

р. *Bacillus* – біоінсектициди, антибіотики, біологічно-активні речовини.

Завдання 4. Приготуйте тимчасові мікробіологічні препарати з культури *Saccharomyces cerevisiae:*

- на знежирене предметне скельце за допомогою піпетки нанесіть підготовлену суспензію хлібопекарських дріжджів (рис.2.7);
- додайте краплю барвника метиленового синього;
- накрийте покривним скельцем (залишки культури видалити за допомогою фільтрувального паперу) та розгляньте під мікроскопом без використання імерсійної олії.

Важливо! Між покривним та предметним скельцями не має бути пухирців повітря, які заважатимуть мікроскопії. Крапля повинна бути невеликою, щоб після «роздавлення» рідина не виступала за край покривного скла.

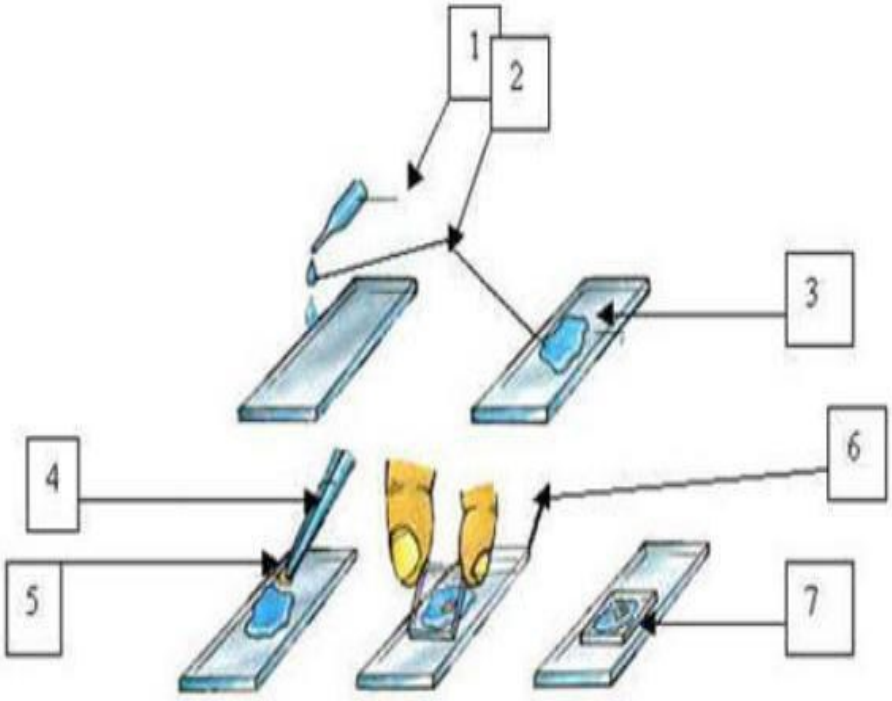


Рис. 2.7. Виготовлення препарату «роздавлена крапля».

За допомогою піпетки (1) крапля води (2) наноситься на середину чистого знежиреного скла (3), за допомогою бактеріологічної петлі (4) вносять культуру мікроорганізмів (5), не допускаючи розтікання рідини (6) краплю обережно накривають покривним склом (7).

- опишіть форму і вкажіть на забарвлені та незабарвлені клітини
- Результати замалюйте у зошиті для лабораторних робіт.

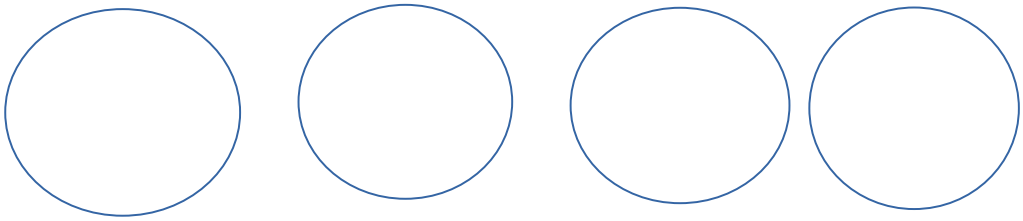


Рис. _____(підписати)

- Вкажіть, які клітини пофарбувалися у синій колір — живі чи мертві? І яких дріжджів було більше?

Контрольні питання:

1. Що таке «біотехнологічні продукти»?
2. Назвіть три основні стадії біотехнологічного процесу, Наведіть їх характеристику.
3. У чому полягає здатність мікроорганізмів до надсинтезу?
4. Назвіть основні біопродуценти, що застосовують у біотехнології.

5. Опишіть методи, які використовуються при підборі біопродуценту для виробництва.

6. Охарактеризуйте методи відділення біомаси від культуральної рідини.

7. Дайте визначення модифікації біотехнологічного продукту.

8. Назвіть методи консервації біопродукції.

9. Опишіть стадії виготовлення тимчасового препарату. Вкажіть для чого їх застосовують у біотехнології.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

«ВІРУСИ ТА БАКТЕРІОФАГИ — БІОПРОДУЦЕНТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ»

Мета роботи: ознайомитися з різними видами мікроорганізмів, які беруть участь у біотехнологічних процесах та освоїти застосування вірусів і бактеріофагів у різних біотехнологічних напрямках.

Матеріали та обладнання: презентація, комерційні препарати бактеріофагів.

У результаті виконання лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- ✓ Знати основні терміни, теорії, концепції, закони у галузі біології та споріднених наук і вміти їх застосовувати;
- ✓ Знати біологічні продуценти, які використовуються у біотехнології та розуміти їх особливості. Оволодіти основними методами та способами культивування біотехнологічних об'єктів.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Першим етапом будь-якого біотехнологічного процесу є підбір *біоб'єктів-продуцентів* (рис.3.1): вірусів, фагів, бактерій, грибів (мікро- і макроміцети), водоростей, найпростіших, черв'яків, рослин, тварин, а також їх тканин, клітин, структурних компонентів — різних біомолекул, органел клітин, культур клітин тканин, продуктів метаболізму тощо.

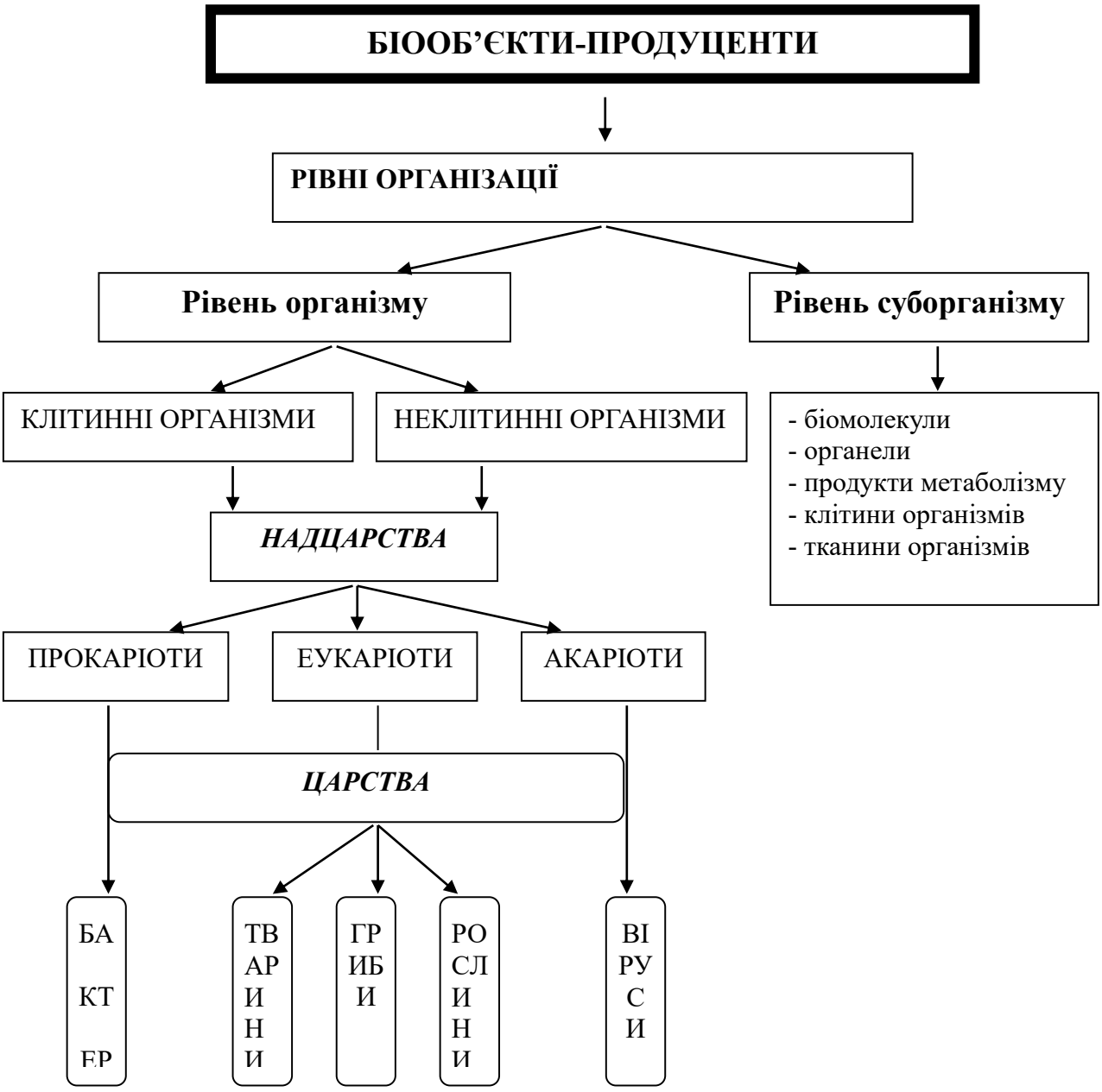


Рис. 3.1. Характеристика біопродуцентів за рівнями організації

На рисунку 3.2 можна розглянути культуру клітин тканин під мікроскопом:

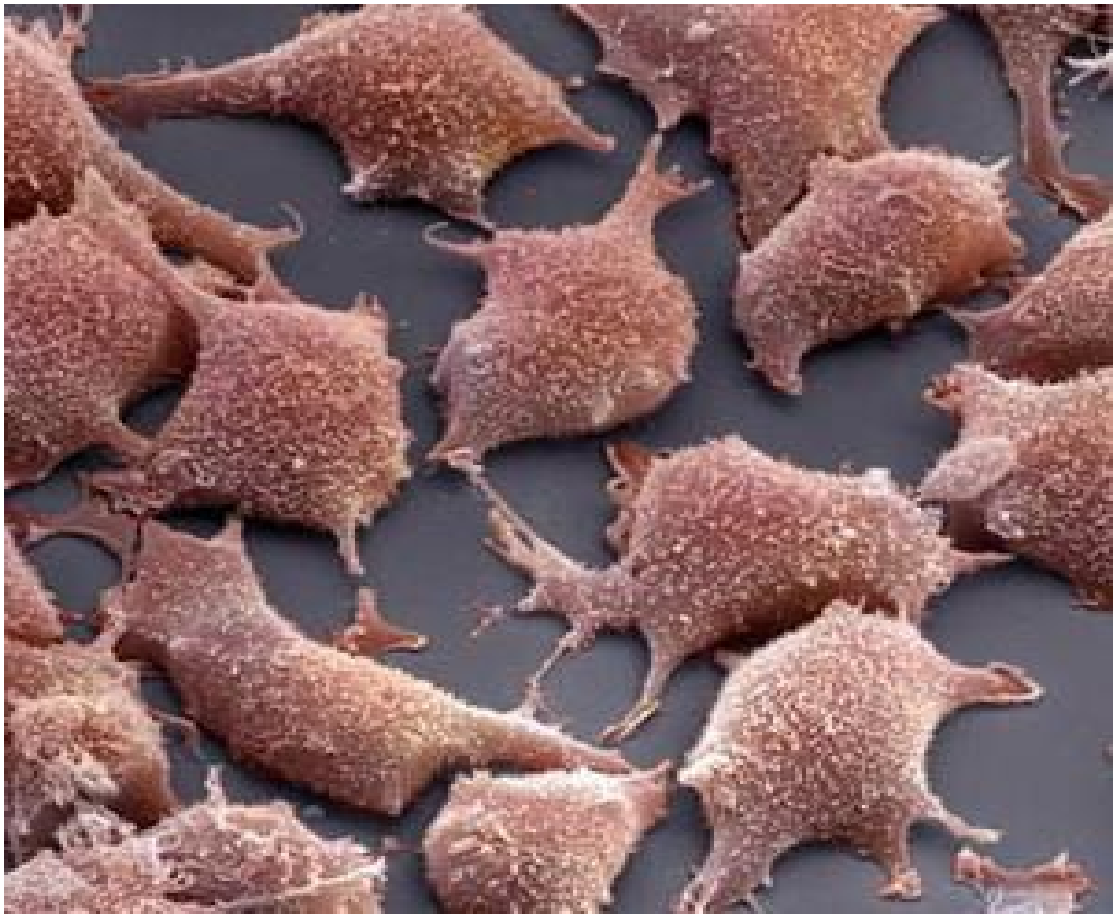


Рис. 3.2. Культура клітин тканин

Розрізняють клітинну та неклітинну форму життя. До неклітинних форм належать *віруси та бактеріофаги*. Основою їх структурної будови є нуклеїнова кислота (ДНК або РНК) та білки, які не пов'язані між собою ковалентними зв'язками.

Віруси (рис 3.3) – біооб'єкти, які не мають клітинної будови, містять тільки один тип нуклеїнових кислот: або молекулу РНК – рибовіруси, або молекулу ДНК – дезоксивіруси ($\approx 10^3$ нуклеотидів або пар нуклеотидів). Віруси є облігатними паразитами та характеризуються дуже малими розмірами. Їх діаметр вимірюються нанометрами та дорівнює 20-300 нм. Нуклеїнові кислоти у вірусній частинці існують у різних формах: одноланцюгова або лінійна молекула, дволанцюгова кільцева або лінійна молекула, чи окремі фрагменти молекули нуклеїнової кислоти. Молекули нуклеїнових кислот знаходяться у білковій оболонці, яка має назву – *капсид*. Віруси не здатні до росту та бінарного поділу. Позаклітинна форма вірусу має назву *віріон*.

Розмноження вірусу (*репродукція*) – це чіткий цикл, який призводить до синтезу нових молекул вірусних білків та великої кількості копій вірусної ДНК, а потім до формування зрілих вірусних часток.

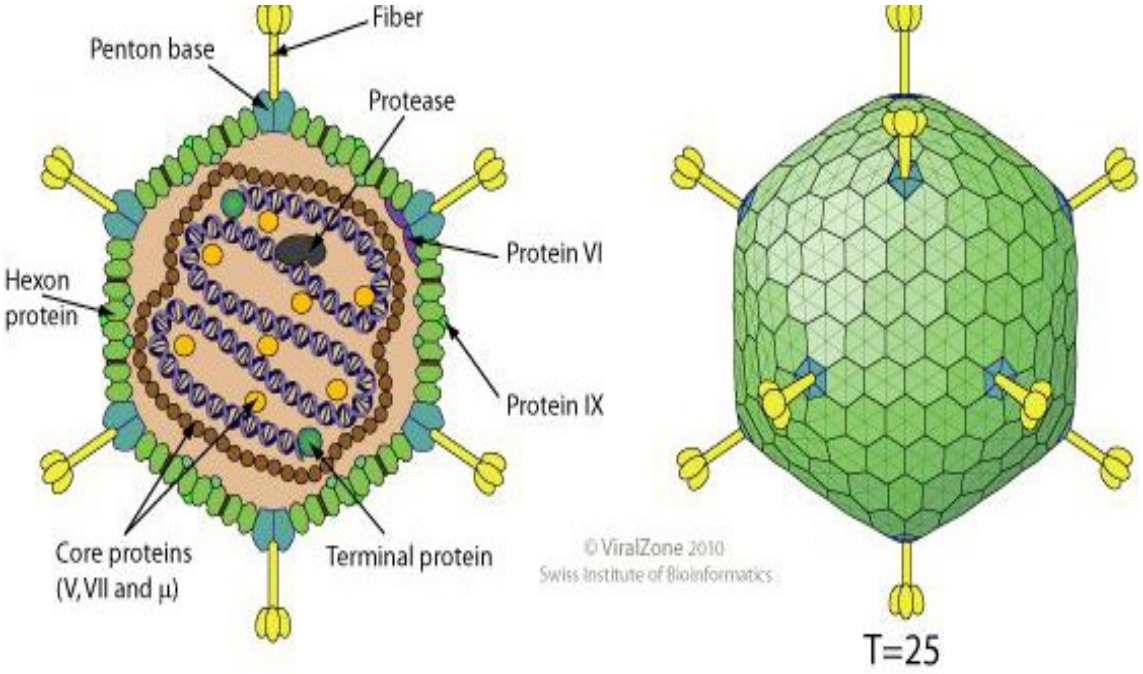


Рис. 3.3. Схема будови віріона аденовірусів

Бактеріофаги – облігатні паразити мікроорганізмів, тобто віруси бактерій. Зазвичай бактеріофаги мають багатогранну призматичну голівку та відросток (розміри 60-200 нм). Вони відносяться до дезоксивірусів: усередині голівки є одна чи дві нитки ДНК. Морфологічні особливості елементів сформованих вірусних часток віріонів з родини міовірусів зображено на рис. 3.4.

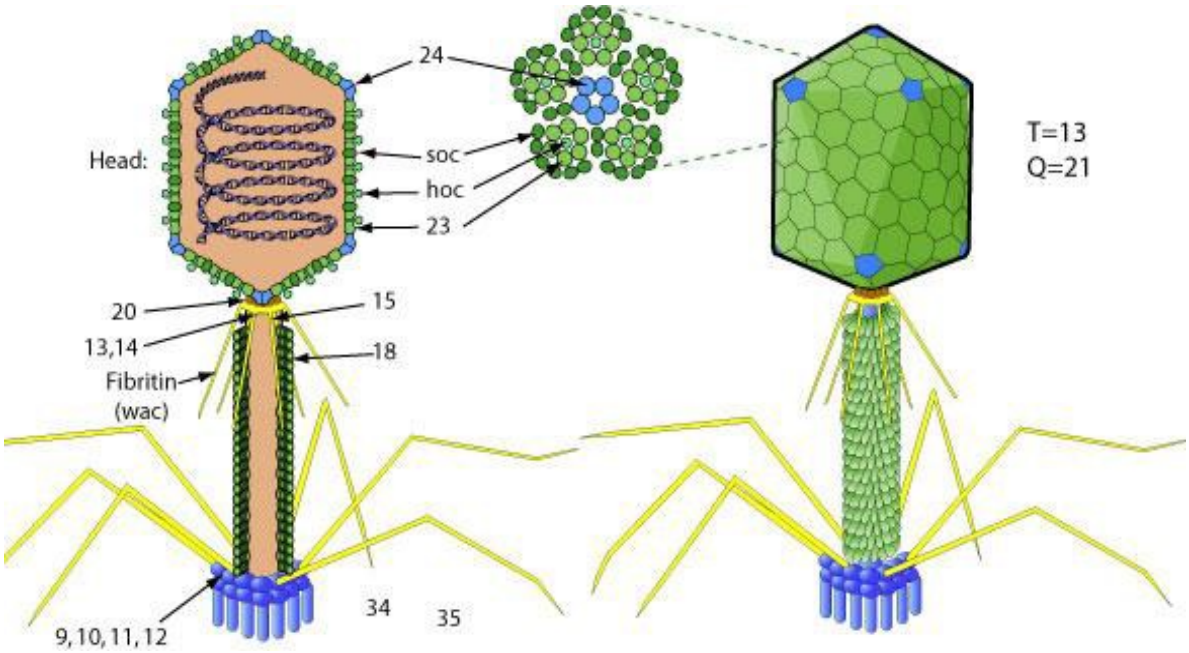


Рис. 3.4. Схематична будова віріона фага з родини міовірусів

Бактеріофаги використовують для діагностики, профілактики та лікування бактеріальних інфекцій: стафілококової, стрептококової, дизентерійної та ін. Механізм дії фагів – лізис клітин бактерій.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Завдання 1. Заповніть таблицю 3.1 «Різноманіття біопродуцентів у біотехнології»:

Таблиця 3.1 — Різноманіття біопродуцентів у біотехнології

Організми-біопродуценти (на таксономічному рівні царства)	Загальна характеристика	Використання у біотехнологіях

Завдання 2. Замалюйте і підпишіть у зошиті рисунки «*Форми вірусів»* і «*Структура вібріону та бактеріофагу»*.

Завдання 3. Розгляньте комерційні препарати бактеріофагів, які застосовують для лікування стоматиту, кишкових інфекцій, при пораненнях, опіках та після хірургічних втручань тощо.

Вкажіть склад та технологію отримання і застосування препарату.

Завдання 4. Наведіть характеристику та особливості вірусу SARS-CoV-2, що викликає коронавірусну інфекцію COVID-19.

Завдання 5. Надайте коротку інформацію про біотехнології виготовлення вакцин проти захворювання COVID-19.

Контрольні питання:

1. Назвіть біопродуценти різних рівнів організації.
2. Опишіть переваги мікроорганізмів порівняно з іншими біопродуцентами.
3. Наведіть загальну характеристику вірусів.
4. Назвіть особливості бактеріофагів.
5. З якою метою у біотехнології застосовують віруси та бактеріофаги? Назвіть продукти на їх основі та сфери застосування.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

«ГРИБИ, ВОДОРОСТІ ТА ЛИШАЙНИКИ ЯК БІОПРОДУЦЕНТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ»

Мета роботи: ознайомитись з біологічними особливостями, різновидами та використанням грибів, водоростей і лишайників у біотехнологічному виробництві.

Матеріали та обладнання: мікроскопи, предметні та покривні скельця, пінцети, піпетки, скальпеля, барвник метиленовий синій, суспензія

добової культури дріжджів *Saccharomyces cereviceae*, чашки Петрі з цвілевими грибами (*Mucor; Penicillium; Aspergillus* тощо), одноклітинні водорості.

У результаті виконання лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- ✓ Знати основні терміни, теорії, концепції, закони у галузі біології та споріднених наук і вміти їх застосовувати;
- ✓ Знати та розуміти особливості різних біологічних продуцентів;
- ✓ Знати біологічні продуценти, які використовуються у біотехнології та розуміти їх особливості. Оволодіти основними методами та способами культивування біотехнологічних об'єктів.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Гриби (Fungi) – це велика група еукаріотичних, гетеротрофних, нефотосинтезуючих організмів. Вегетативне тіло грибів складається з системи розгалужених тонких ниток – *гіф*, які утворюють *грибницю (міцелій)*. За структурою міцелію гриби поділяють на вищі та нижчі. У вищих грибів клітини міцелію мають септи. Основною речовиною клітинної стінки грибів є хітин.

Ядер у грибних клітинах може бути одне, два або багато, пластиди відсутні, запасними речовинами у цитоплазмі є жири, глікоген, волютин. Деякі гриби здатні синтезувати отруйні речовини (мускарин, фаллоїдин). Гриби розмножуються вегетативним, нестатевим та статевим шляхом. Вегетативне розмноження відбувається частинами міцелію. Нестатеве – за допомогою спеціальних спор або конідій.

Гриби мають спільні ознаки з рослинними та тваринними організмами. З тваринами їх об’єднує: наявність хітину у клітинній стінці та глікогену у клітині, відсутність пластид, гетеротрофне живлення, потреба у вітамінах; з рослинами: здатність до необмеженого росту, живлення шляхом всмоктування речовин, нерухомість, розмноження спорами, наявність вакуолей.

До мікроскопічних грибів – мікроміцетів – відносяться дріжджі та цвілеві гриби (мукор, пеніцил, аспергил, дріжджі та ін., рис. 4.1, А-Г).

Використання мікроскопічних грибів дозволяє одержувати ряд цінних речовин, а саме: амілолітичні та ліполітичні ферменти, вітаміни (ß-каротин, вітаміни групи В), харчовий білок, антибіотики, органічні кислоти тощо. Вони є активними продуцентами ферментів для виготовлення сирів, кисломолочної продукції, отриманні етанолу, пива, вина і т.п.

Макроскопічні гриби (рис. 4.1, Д) – макроміцети (базидіоміцети: глива, печериця, білий гриб, лисички та ін.) – є продуцентами харчового білка. Виявляють бактерицидну та протипухлинну активність вищих базидіоміцетів.

Представники Царства *Fungi* складають найбільшу екологічна групу, яка приймає участь у мінералізації органічних речовин у екосистемах, тобто колообігу речовин.

Водорості (Algae) – це нижчі таломні рослини, первинним середовищем існування яких є вода. Вони включають десять самостійних відділів: зелені, жовто-зелені, золотисті, діатомові, бурі, червоні, пірофітові, евгленові, харові, синьо-зелені. Синьо-зелені або ціанобактерії – належать до прокаріотів, інші відділи водоростей є еукаріотами. До їх складу входять пігментами хлорофіл ***а*** і ***в***, каротиноїди та крохмаль. Деякі види мають джгутики. Нестатеве розмноження відбувається зооспорами, вегетативно, поділом навпіл або брунькуванням. Статевий процес відбувається у формі гологамії та мерогамії.

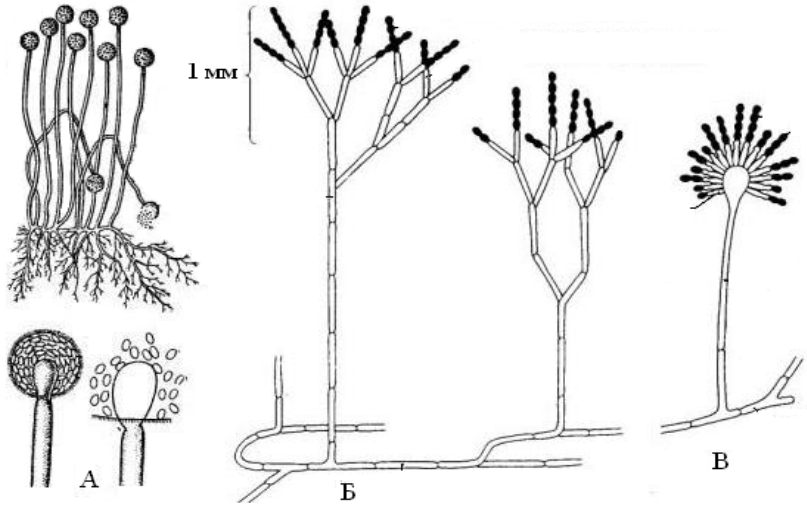
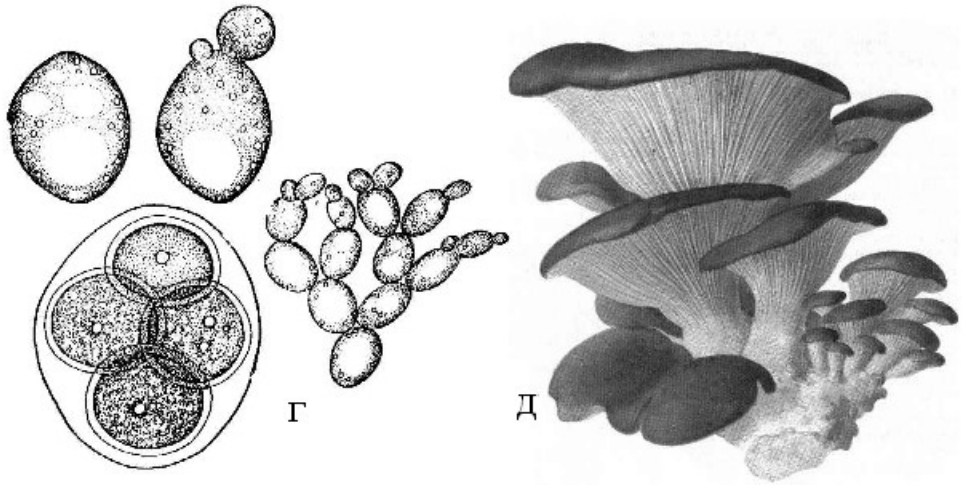


Рис. 4.1. Мікроміцети та макроміцети:
А – міцелій та спорангієносці зі спорами гриба *Mucor*;
Б – мікроскопічна китиця конідієносця *Penicillium*;
В – мікрофотографія *Aspergillus niger*;
Г – клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* окремі та ті, що брунькуються;
Д – Глива звичайна *Pleurotus ostreatus*.



За типами водорості підрозділяються на активно рухомі одноклітинні та колоніальні, нерухомі одноклітинні та багатоклітинні, нитчасті, пластинчасті і сифонові (мають багатоядерний талом) (рис. 4.2).

Фотосинтезуючі клітини водоростей, поглинаючи енергію видимого світла, перетворюють її в хімічну енергію фосфатних зв'язків АТФ. При цьому фіксуються карбон, нітроген, фосфор і включаються до складних молекул органічних речовин (накопичується біомаса).

На основі водоростей отримують харчові добавки, кормовий білок, мікроелементи (йод, бром), ферменти, органічні кислоти, агар-агар. За допомогою водоростей можливе отримання біомаси та біологічно активних речовин у системах життєзабезпечення космічних кораблів, енергії (фотоліз води), очищення стічної води в аеротенках та за допомогою біофільтрів тощо.

Рис. 4.2. Види водоростей

Лишайники (Lichenes) є потенційними біооб'єктами для біотехнології. Це сімбіотичні організми, які утворені грибом – гетеротрофним мікобіонтом (переважно аскоміцетами, іноді базідіоміцетами) та автотрофним фікобіонтом – водоростями (зеленими або ціанобактеріями).

Вегетативне тіло лишайників – це талом (слань), у якому гіфи грибів сплітаються з водоростями, утворюючи міцну структуру. За морфологічною ознакою виділяють три основні групи лишайників:

– накипні або коркові – тіло у вигляді накипі, яка вкриває субстрат та тісно зростається з ним усією поверхнею (рис. 4.3, А), що практично невіддільна від нього; накипні лишайники складають біля 80% всіх лишайників;

– листкові – тіло у вигляді листоподібних пластинок, які прикріплені до субстрату пучками гіф (ніжка) та легко відділяються від нього (рис. 4.3, В);

– кущові – талом у вигляді більш або менш розгалужених кущів довжиною до 15 см, які підіймаються від субстрату (ґрунту) або звисають з гілок. У кущових лишайників талом є циліндричним із “серцевиною” у центрі (рис. 4.3, Б).

Розмноження лишайників переважно вегетативне — фрагментами талому, ростуть вони повільно – за рік у різних видів слань збільшується на 1-10 мм.

А Б В

Рис. 4.3. Морфологічні групи лишайників:
А – накипний; Б – кущовий; В – листуватий

У біотехнології лишайники можливо застосовувати для отримання натуральних барвників, для фіксації запахів у парфумах, у якості продукту харчування та джерела ліхенових кислот, що володіють бактерицидною активністю.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Завдання 1. Замалюйте і підпишіть у зошиті: рис. 4.1. *Мікроміцети та макроміцети,* рис. 4.2 *Типи водоростей* та рис. 4.3 *Морфологічні групи лишайників*.

Завдання 2. Опишіть у таблиці 4.1 біологічні особливості і сфери біотехнологічного застосування грибів, водоростей і лишайників:

Таблиця 4.1 – Біологічні особливості та застосування грибів, водоростей та лишайників у біотехнології

Група організмів	**Біологічні особливості**	**Застосування у біотехнологічних процесах**
Дріжджі		
Цвілеві гриби		
Гриби макроміцети		

Водорості		
Лишайники		

Завдання 3. Приготуйте тимчасові мікробіологічні препарати та розглянути під мікроскопом:

а) з донного мулу та культури водоростей і розгляньте їх під мікроскопом без застосування імерсійної системи.

Окремо приготуйте тимчасовий препарат з чистої культур дріжджів, який зафарбуйте метиленовою синню та також розгляньте під мікроскопом, порівняйте їх, вкажіть на відмінності.

б) розгляньте під мікроскопом плісняві гриби, що виросли на чашках Петрі та знайдіть у них спори. Приготуйте препарати за методами «висяча крапля» та «відбиток».

Метод «висячої краплі». Препарат «висяча крапля» використовують для виявлення рухливості біопродуцентів, спостереження за процесами розмноженням, утворенням і проростанням спор тощо. Технологія приготування:

а) невелику краплю суспензії мікроорганізмів нанесіть на покривне скло,

б) переверніть його краплею вниз і помістіть на спеціальне предметне скло з лункою (заглибленням) у центрі, крапля повинна вільно звисати, не торкаючись країв і дна лунки.

Якщо краї лунки попередньо змастити вазеліном, то крапля буде герметично замкнена у вологій камері, що дозволяє багатоденне спостерігання за об'єктом.

в) препарати розгляньте під мікроскопом, злегка затемнюючи поле зору (для цього конденсор потрібно опустити).

Препарат «відбиток» - дані препарати є зручними для вивчення природного розташування клітин у колонії мікроорганізмів та особливо для дослідження форми спор і спороносців актиноміцетів та грибів. Технологія приготування:

а) з агаризованої пластинки, на якій мікроорганізмів виросли суцільним газоном, видаліть скальпелем невеликий блок і перенесіть на предметне скло так, щоб поверхня грибів була звернена нагору.

б) до грибів прикладіть чисте покривне скло і акуратно та швидко зніміть.

в) отриманий препарат помістіть відбитком вниз у краплю води (або метиленового синього) на предметне скло і розгляньте під мікроскопом із сухою системою. *Відбитки можна фіксувати та забарвлювати будь-яким способом.*

г) помістіть чашку Петрі з культурою пліснявих грибів на предметний столик мікроскопу та під найменшим збільшенням розгляньте їх будову.

д) замалюйте у зошит для лабораторних робіт усі спостереження.

Завдання 4. Розгляньте під імерсійною системою мікроскопу (збільшення у 40 та більше разів) зафарбовані за Грамом фіксовані препарати грибів. Замалюйте у лабораторний зошит.

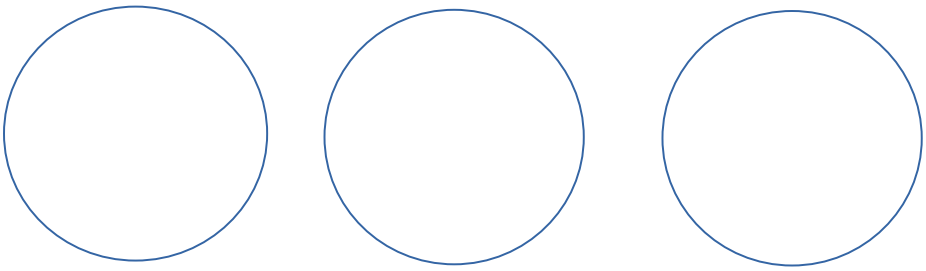


Рис. _____

Завдання 5. Під час мікроскопії визначте морфологічні особливості розглянутих культур – форму клітин, їх розташування, наявність спор та позаклітинних включень – кристалів тощо.

Завдання 6. Сформуйте висновки та зафіксуйте їх у лабораторному зошиті.

Контрольні питання:

1. Наведіть загальну характеристику мікроміцетів.
2. З якою метою у біотехнології застосовують дріжджові та плісняві гриби?
3. Назвіть гриби, які є збудниками інфекційних грибкових захворювань у людей, тварин та рослин.
4. Наведіть продукти біотехнології, що отримано шляхом культивування мікро- та макроміцетів.
5. Водорості у біотехнології, їх роль у отримання харчових добавок та у технологіях захисту навколишнього середовища.
6. Охарактеризуйте особливості лишайників як біопродуцентів.
7. Опишіть технологію приготування препарату «висяча крапля» та відбиток. З якою метою можна застосовувати дані препарати?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

«НАЙПРОСТІШІ ТА ВЕРМИКУЛЬТУРА У БІОТЕХНОЛОГІЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ»

Мета роботи: ознайомитись з біологічними особливостями найпростіших та процесом вермикультивування

Матеріали та обладнання: мікроскоп, предметні та покривні скельця, піпетка, представники найпростіших (*Protozoa*), культура черв'яків р. *Eisenia*.

У результаті виконання лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- ✓ Знати та розуміти особливості різних біологічних продуцентів;

✓ Розуміти роль біооб'єктів у охороні навколишнього середовища, застосовувати мікроорганізми різних родів та видів з метою біологічної очистки води, ґрунту та газоподібних відходів, проводити санітарний контроль мікробіологічних показників води, повітря і ґрунту.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Найпростіші (Protozoa) – мікроскопічні одноклітинні тварини Надцарства *Eucariotae*, які мешкають у воді, ґрунті або є паразитами тварин та людини. Підцарство включає п’ять типів: Саркодові, Джгутикові, Споровики, Інфузорії, Кнідоспоридії. Класифікація найпростіших заснована на способах переміщення: за допомогою псевдоподій (псевдоніжки) – амеби, форамініфери, радіолярії; джгутиків – евглена зелена, лямблії, трипаносоми; чи війок – інфузорія-туфелька, сувійки або нерухомі форми, наприклад, малярійний плазмодій. Тіло найпростіших складається з цитоплазми, одного або декількох ядер і органоїдів, які виконують певні життєві функції. За несприятливих умов навколишнього середовища, найпростіші формують цисту (рис. 5.1).

Найпростіші входять до складу ґрунтових біоценозів, активних мулів (зооглея), які використовуються у процесах біологічного очищення водоймищ та стічних вод. В активному мулі найпростіші підтримують якісний та кількісний склад мікроорганізмів. Живлячись бактеріями та речовинами, вони контролюють їх концентрацію та сприяють освітленню води. *Protozoa* застосовують у якості тест-індикаторів якості очищення стоків.

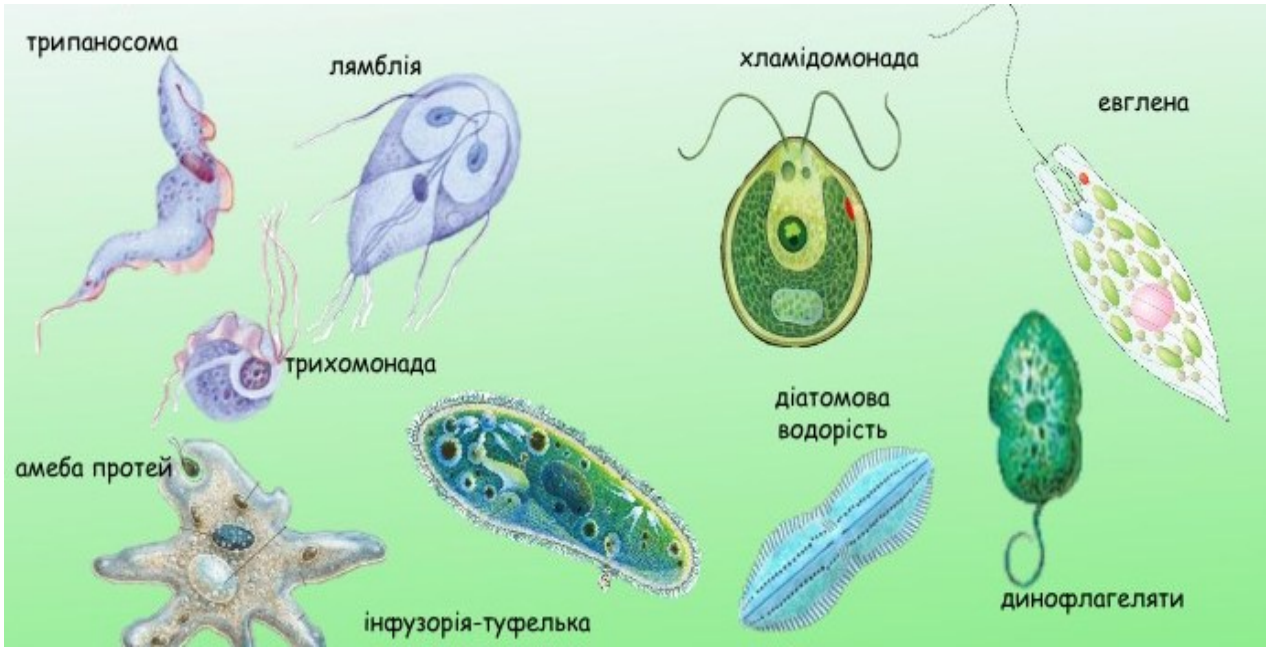


Рис. 5.1. Найпростіші – одноклітинні тварини

Черв'яки (Annelida). Серед багатоклітиних тварин у біотехнології використовують черв'яків типу Кільчасті (Клас Малощетинкові черв'яки-олігохети). Олігохети – велика група тварин, поширених переважно у ґрунті та прісних водоймах. Все тіло тварини поділено перетяжками на окремі ділянки – кільця, які називаються *сегментами* або *сомітами*. Число сегментів тіла може коливатися від 5-6 до 500-600, які звичайно несуть по чотири пучка щетинок. Пересуваються за рахунок почергових скорочень шкірно-м'язового мішка. Малощетинкові черв'яки – гермофродити з прямим типом розвитку (рис. 5.2).

Рис. 5.2. Біотехнологічний об'єкт – представник вермикультури, р. *Eisenia*

Одними із найбільш відомих представників олігохет є дощові черв'яки. Дощові черв'яки та інші ґрунтові малощетинкові відіграють надзвичайно важливу роль у процесах ґрунтоутворення. Дощові черв'яки живляться відмерлими рештками рослин, перетравлюють їх та виділяють копроліти, і таким чином збагачують ґрунт органічними речовинами та корисними мікроорганізмами. У процесі перетравлення залишок рослин у кишківнику черв'яків формуються органічні речовини, з яких утворюється гумус.

Вченими штучно створена високопродуктивна порода цих тварин – вермикультура, яка здійснює процес вермикультивування — трансформацію різних органічних речовин у найякісніше у світі біодобриво — біогумус. Окремо біомасу черв'яків можна використовувати для годівлі тварин, так як це якісний білок, а з біогумусу отримувати біогумат (витяжка, яка містить комплекс біологічно активних речовин, зокрема фітогормонів).

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Завдання 1. Замалюйте і підпишіть у зошиті рис. 5.1 та 5.2.

Завдання 2. Опишіть склад та властивості активного мулу як складової для очистки стічних вод.

Завдання 3. Приготуйте тимчасові препарати з поживного середовища, що містить інфузорії-туфельки, розгляньте їх під мікроскопом та замалюйте у зошит для лабораторних робіт.

Завдання 4. Розгляньте під мікроскопом фіксовані препарати найпростіших, використовуючи різне збільшення та замалюйте у зошит.

Завдання 5. Ознайомтеся з вермикультурою, що складається з черв'яків р. *Eisenia.* Розгляньте представників, відділіть молодих особин від статевозрілих, відберіть кокони (якщо вони наявні у субстраті). Вкажіть колір та підрахуйте число сегментів на тілі тварини.

Завдання 6. Опишіть технологію вермикультивування та наведіть приклади використання черв'яків для переробки відходів та у рекультивації земель.

Контрольні питання:

1. Наведіть загальну характеристику найпростіших.
2. Опишіть сфери застосування найпростіших у біотехнології.
3. Назвіть представників найпростіших, що викликають захворювання у людей та тварин. Які особливості їх життєвого циклу?
4. Які захворювання викликають малярійний плазмодій та муха Це-це? Охарактеризуйте життєвий цикл збудників.
5. Назвіть чотири класи найпростіших та наведіть представників.
6. Що таке вермикультура та які її особливості?
7. Охарактеризуйте сфери застосування черв'яків р. *Eisenia.*
8. Чому вермикультуру можна застосовувати для вигодовування тварин?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

«ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА, ЩО ЗАСТОСОВУЮТЬ У БІОТЕХНОЛОГІЇ»

Мета роботи: ознайомитися з різними видами поживних середовищ та способами їх приготування.

Матеріали та обладнання: різні види поживних середовищ у пробірках і чашках Петрі, субстрати, що застосовують у якості компонентів живильних середовищ для біопродуцентів.

У результаті виконання лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- ✓ Знати та розуміти особливості різних біологічних продуцентів;
- ✓ Розуміти роль біооб'єктів у охороні навколишнього середовища, застосовувати мікроорганізми різних родів та видів з метою біологічної очистки води, ґрунту та газоподібних відходів, проводити санітарний контроль мікробіологічних показників води, повітря і ґрунту.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Важливим етапом біотехнологічного процесу є *культивування мікроорганізмів* – вирощування їх на штучних поживних середовищах (субстратах).

До складу поживних середовищ входить необхідний набір різних хімічних елементів, які потребує певний біопродуцент. Вони є джерелами живлення та енергії для біооб'єктів.

Ріст та розвиток мікроорганізмів відбувається, коли у зовнішньому (поживному) середовищі присутні всі необхідні поживні речовини для проходження пластичних та енергетичних процесів (анаболізму і катаболізму), а саме: джерела карбону, нітрогену, оксигену та гідрогену, зольних макроелементів (*P, S, K, Mg, Ca, Fe*) та мікроелементів.

Різноманітність метаболічних процесів у клітинах мікроорганізмів визначають їх різні потреби в поживних елементах. Важливою складовою будь-якого середовища є вода.

Поживні середовища для культивування мікроорганізмів бувають 3-х видів:

- природні (натуральні);
- синтетичні (штучні);
- напівсинтетичні.

Поживні середовища можуть бути невизначеного складу, тобто включати біогенні (рослинні, тваринні, мікробні) речовини – **натуральні середовища**; а можуть складатися з чітко визначених концентрацій хімічних речовин – **синтетичні середовища; напівсинтетичними** є ті середовища до складу яких, окрім натурального субстрату додаються чітко встановлену кількість хімічних компонентів. Найбільш поширеними є напівсинтетичні субстрати.

Компонентний склад субстратів залежить від потреб біооб'єкту у поживних речовинах (*автотрофи* синтезують органічні речовини клітин з CO_2 та H_2O з утилізацією сонячної енергії, а *гетеротрофи* потребують органічні джерела карбону та (або) енергії).

У біотехнологічних процесах використовуються різні за фізичним станом поживні середовища: тверді, рідкі, напіврідкі, сипучі.

У біотехнології з метою виділення мікроорганізмів з природних місць їх існування застосовують **елективні** (вибіркові) середовища, які забезпечують переважний розвиток необхідної групи мікроорганізмів (рис.6.1).

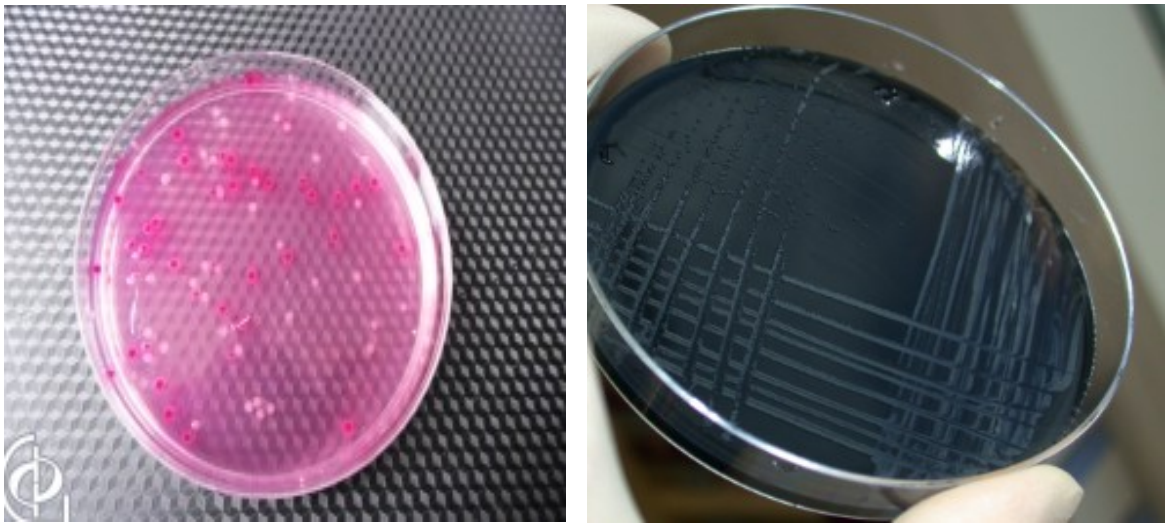


Рис. 6.1. Приклади поживних середовищ за призначенням:
А – середовище Ендо диференційно-діагностичне; Б – елективне середовище Вільсона-Блера

Сировина, яка застосовується у якості складників поживного середовища, повинна бути дешевою та доступною.

Приклади поживних субстратів, які широко використовуються у біотехнології наведені у табл. 6.1.

Таблиця 6.1. — Основні види субстратів для поживних середовищ, що застосовують у біотехнології

Субстрат	Призначення	Сировина для одержання субстрату
1. Вуглеводи		
Глюкоза	Джерело “С” та енергії	Крохмаль, целюлоза
Сахароза	___ " ___	Цукровий буряк, тростина
Лактоза	___ " ___	Молочна сироватка
Крохмаль	___ " ___	Картопля, кукурудза та ін.
Целюлоза	___ " ___	Рослинна сировина
2. Спирти		
Етанол	Джерело “С” та енергії	Цукрові субстрати рослинного походження, вуглеводні нафти
Метанол	___ " ___	Рослинні гідролізати
3. Вуглеводневі		
Алкани (C_1-C_9; C_{10}-C_{20} і більш	Джерело “С” та енергії	Нафта, газовий конденсат
4. Азотовмісні сполуки		
Сульфат амонію	Джерело “N”	Мінеральні речовини
Аміак	___ " ___	
Сечовина	___ " ___	
Гідрофосфат амонію	Джерело нітрогену і фосфору	
5. Субстрати невизначеного складу		
Меляса	Джерело “С” та енергії	Побічний продукт цукрового виробництва

Сульфітні щолока	Джерело “С” та енергії, мінеральних солей	Деревина, побічний продукт її переробки
Рослинні гідролізати	Джерело карбону, енергії	Однорічні рослини, деревина (гідроліз)
Рослинні та тваринні жири	—— " ——	Рослинна та тваринна сировина
Дріжджовий екстракт	Джерело С, N, енергії, мінеральних солей	Пивні або пекарські дріжджі
Соєве борошно	—— " ——	Соєві боби після видалення олії

За участю поживних речовин субстратів (розчинів макро- та мікроелементів) отримується різноманітна біотехнологічна продукція: кормовий білок, ферментні препарати, органічні кислоти, спирти, амінокислоти, вітаміни тощо.

Варіанти рецептур поживних середовищ для культивування мікроорганізмів у біотехнологіях

1. Натуральні середовища, які є гарними субстратами для росту та розвитку багатьох видів молочнокислих, оцтовокислих бактерій, дріжджів, мікроскопічних грибів та ін.:

– Пивне сусло на основі солоду. Основні компоненти: вуглеводи (мальтоза, декстрини) до 90% від загальної маси сухого залишку, азотовмісні речовини (6-7% від загальної маси сухого залишку), вітаміни, органічні кислоти, мінеральні солі. Сусло стерилізують при 0,5 атм 30 хвилин.

– М’ясо-пептоний бульйон (МПБ) — універсальне поживне середовище, основою якого є водний екстракт м’яса, до якого додається 1% пептону (продукту неповного розщеплення білків) та 0,5% NaCl. МПБ стерилізують при 1 атм 20 хвилин.

– Дріжджове середовище — складається з дріжджової води (70-100 г свіжих пресованих або 7-10 г сухих дріжджів 30 хв кип’ятять у 1 л води, потім фільтрують) і мінеральних солей (0,1% K_2HPO_4, 0,5% NaCl). Стерилізують при 0,5 атм 20-30 хвилин.

– Картопляне середовище — це відвар картоплі (200 г картоплі на 1 л води).

2. Синтетичні середовища:

Середовище Чапека для культивування мікроскопічних грибів: глюкоза – 30 г; $NaNO_3$ – 2 г; KH_2PO_4 – 1 г; $MgSO_4$ – 0,5 г; KCl – 0,5 г; $FeSO_4$ – 0,01 г; H_2O – 1 л.

3. Напівсинтетичні середовища:

МПБ з додаванням глюкози і фосфорнокислого калію однозаміщеного або картопляне середовище з додаванням глюкози та пептону тощо.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Завдання 1. Дайте визначення і коротко опишіть різні поживні середовища для культивування мікроорганізмів – натуральні, синтетичні, напівсинтетичні, елективні.

Завдання 2. Надайте інформацію про агар-агар як важливий компонент поживних середовищ, вкажіть з якою метою його застосовують.

Завдання 3. Наведіть декілька рецептур поживних середовищ для культивування мікроорганізмів у біотехнологіях.

Завдання 4. Складіть таблицю з характеристикою досліджених видів сировини, яка використовується для приготування живильних середовищ у біотехнології.

Таблиця 6.2 — Види біотехнологічної сировини

№ п/п	Вид сировини	Поживні речовини (субстрат)	Біотехнологічне призначення
1 2 3 4 …			

Завдання 5. Підготуйте до стерилізації:

а) чашки Петрі, завернувши їх у папір по 5 шт;

б) поживні середовища, такі як м’ясо-пептонний агар (МПА) та середовища Сабуро у колбах.

– МПА є універсальним середовищем для культивування мікроорганізмів: зробити наважки комерційного середовища згідно інструкції щодо застосування та внести у колбу з пробкою; додати дистильовану воду згідно кількості порошку; прокип’ятити на водяній бані для уникнення утворення згустків середовища; остудити та зробити паперовий ковпачок, на якому вказати режими стерилізації. **Важливо!** Кількість поживного середовища у колбі має не перевищувати 70% її вмісту.

– Сабуро є універсальним середовищем для вирощування грибів та дріжджів, приготувати аналогічно способу описаному вище та згідно інструкції.

Контрольні питання:

1. Опишіть природні середовища існування мікроорганізмів.
2. Які елементи використовують для живлення автотрофів та гетеротрофів?
3. Види поживних середовищ, їх класифікація за призначенням.
4. Наведіть приклади поживних середовищах за консистенцією.
5. Наведіть приклади поживних середовища натурального, синтетичного та напівсинтетичного складу, що застосовується у біотехнології.
6. Опишіть технологію приготування комерційних поживних середовищ.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

«КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ПОВІТРЯ НА ПІДПРИЄМСТВАХ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ»

Мета: освоїти методи контролю якості повітря на біотехнологічних підприємствах та провести його бактеріологічне дослідження.

Матеріали та обладнання: стерильна водопровідна вода, МПА, Сабуро, пробірки, чашки Петрі, мікроскоп, набір для фарбування за Грамом, предметні скельця.

У результаті виконання лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- ✓ Знати організацію біотехнологічної лабораторії та джерела контамінації, шляхи їх усунення. Розуміти значення асептики та стерильності на біотехнологічних виробництвах.
- ✓ Розуміти роль біооб'єктів у охороні навколишнього середовища, застосовувати мікроорганізми різних родів та видів з метою біологічної очистки води, ґрунту та газоподібних відходів, проводити санітарний контроль мікробіологічних показників води, повітря і ґрунту.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

До складу мікрофлори повітря входить близько 100 різних видів сапрофітних мікроорганізмів. Умовно мікрофлору повітря можна розділити на: постійну, тобто та, яка часто виявляється у повітрі, і змінну, яка знаходиться в ньому не завжди і менш стійка до дії різноманітних чинників навколишнього середовища.

Постійна мікрофлора переважно формується за рахунок мікроорганізмів ґрунту. До неї відносяться різноманітні пігментоутворюючі коки, спороутворюючі та неспороутворюючі палички, актиноміцети, дріжджі та інші гриби тощо. Найчастіше з повітря виділяються наступних представників: *Micrococcus roseus, M. luteus, Bacillus subtilis, B. cereus, B. mesentericus, Actinomyces sp., Penicillium sp., Aspergillus sp., Mucor sp.* тощо. Пігментоутворюючі форми мікроорганізмів, завдяки наявності каротиноїдів, більш стійкі до дії УФ-променів, що забезпечує їм здатність зберігатися у повітрі.

Кількісний та якісний склад мікрофлори атмосферного повітря залежить від характеру ґрунту та наявності водних джерел, загального санітарного-гігієнічного стану місцевості, сезонних, кліматичних та метеорологічних факторів (інтенсивності сонячної радіації, температури, атмосферних опадів тощо).

Під час визначення санітарного стану закритих приміщень, залежно від задач дослідження, встановлюють:

1. загальне мікробне число,
2. присутність санітарно-показових мікроорганізмів

До санітарно-показових мікроорганізмів належать, наприклад, стафілококи та α- і β-гемолітичні стрептококи. Вони є показниками біологічної контамінації повітря мікрофлорою носоглотки людини.

На підприємствах мікробіологічної та біотехнологічної промисловості визначається присутність та кількісний вміст у повітрі мікробів-продуцентів з метою запобігання їхнього впливу на організм працівників у зв'язку з можливістю захворювання та розвитком сенсибілізації.

Санітарно-мікробіологічне дослідження обладнання, робочих місць та спецодягу персоналу проводиться для здійснення контролю загального гігієнічного стану (поточного санітарного контролю), визначення фекальної забрудненості та контамінації патогенними мікроорганізмами об'єктів навколишнього середовища, як можливих факторів при передачі збудників інфекційних захворювань. *Санітарно-мікробіологічне дослідження проводиться планово і за екстреними показами.*

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Завдання 1. Розлийте, за допомогою викладача у стерильні чашки Петрі по 20-25 мл:

а) МПА для визначення кількості бактерій;

б) середовище Сабуро для розвитку дріжджів та грибів.

Увага! Під час роботи дотримуйтеся умов стерильності за допомогою асептичних заходів та відкритого вогню спиртівки. Чашки Петрі з розлитим поживним середовищем мають підсохнути для подальшої роботи з ними.

Завдання 2. Визначте кількісний та якісний склад повітря за допомогою **седиментаційного методу або методу Коха,** який є найпростішим. Даний метод ґрунтується на осіданні бактерій та крапель під дією сили тяжіння на поверхню агару відкритої чашки Петрі. В атмосферному повітрі, водночас з осадженням, мають значення потоки повітря, завдяки яким великі пилові частки прибиваються до поверхні агару.

Для цього: чашки Петрі з МПА відкривають та експонуються 5 – 10 – 15 хв, залежно від очікуваного бактеріального забруднення у лабораторії або іншому приміщенні. Експозиція для чашок з елективними середовищами становить від 30 хв до 1 год.

Метод седиментації не є кількісним, однак може бути використаний у разі, коли відсутні необхідні для кількісного аналізу прилади чи відсутнє джерело електроенергії.

Цікаво! На підприємствах *молочної промисловості* санітарний стан виробничих приміщень оцінюють за двома мікробіологічними показниками: загальною кількістю бактерій (мікрококів, паличкоподібних) та кількістю цвілевих грибів і дріжджів, які осідають із повітря на поверхню МПА та сусло-агару (Сабуро) у чашках Петрі за 5 хв. Підрахунок колоній мікроорганізмів проводять на 100 $см^2$ поверхні чашки Петрі з щільним поживним середовищем. Залежно від кількості колоній мікроорганізмів, санітарний стан повітря виробничих приміщень оцінюють за 4-х бальною

системою (відмінно, добре, задовільно та незадовільно). Наприклад, якщо загальна кількість бактерій у повітрі не перевищує 50, а цвілеві гриби та дріжджі не виявлені, то санітарний стан повітря у цехах оцінюють як «добре».

На підприємствах *м'ясної промисловості* проводять аналіз повітря холодильних камер на виявлення забруднення його цвілевими грибами. Повітря досліджують перед закладанням м'яса у камери (до та після дезінфекції) і періодично (не менше 1-го разу протягом періоду зберігання м'яса). Підрахунок ведуть за кількістю колоній цвілевих грибів, які виросли на 100 $см^2$ поверхні сусло-агару або іншого середовища, призначеного для вирощування дріжджів та грибів, у чашках Петрі (при температурі в камері – 12°С і вище). Санітарний стан повітря холодильних камер оцінюють за 3-х бальною системою (добре, задовільно і незадовільно). Якщо на середовищі виросло не більше, ніж 10 колоній цвілевих грибів, то санітарний стан повітря вважають добрим.

Завдання 3. Після того, як час експозиції завершено, чашки Петрі з МПА та Сабуро накрийте кришками та помістіть у термостат при 29º С (за такої температури розвивається сапрофітна мікрофлора) на 24-48 год та 48-72 год відповідно.

Завдання 4. На наступному лабораторному занятті підрахуйте результати та зробіть висновки: із колоній, які виросли на МПА та Сабуро приготуйте мікробіологічні фіксовані препарати, використовуючи метод простого забарвлення та розгляньте під мікроскопом, застосовуючи імерсійну систему. Усі спостереження замалюйте у зошит для лабораторних робіт.

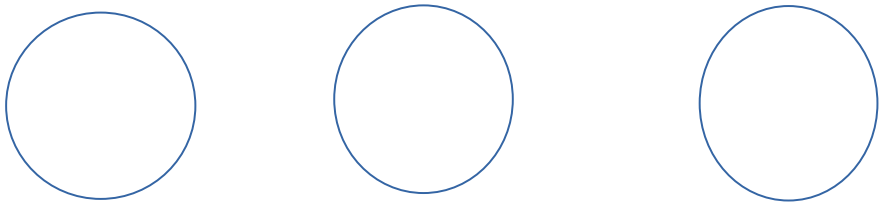


Рис. _____

Метод простого забарвлення клітин мікроорганізмів (фіксований препарат). Дослідження фіксованих забарвлених препаратів – найбільш розповсюджений мікробіологічний метод для виявлення морфологічних особливостей, кількісного обліку мікроорганізмів, а також для перевірки чистоти культури. Фіксовані забарвлені препарати можуть зберігатися тривалий час і розглядаються з імерсією.

Для простого забарвлення мікроорганізмів застосовують якийсь один з основних анілінових барвників: метиленовий синій, основний фуксин, генціановий фіолетовий, кристалічний фіолетовий. При цьому профарбовується вся клітина (рис. 7.1).

Етапи приготування мазка:

а) за допомогою стерильної бактеріологічної петлі чи піпетки на знежирене предметне скло у краплю води внесіть мікроорганізми з дослідної колонії;

б) матеріал рівномірно тонким шаром розподіліть на площі 1-2 $см^{2;}$

в) висушіть приготовлений мазок при кімнатній температурі, тонкий мазок висихає дуже швидко.

Якщо висушування мазка відбувається повільно, препарат можна злегка прогріти у струмені теплого повітря, тримаючи предметне скло високо над полум'ям пальника мазком нагору. Цю операцію проводять дуже обережно, не перегріваючи мазка, інакше клітини мікроорганізмів деформуються.

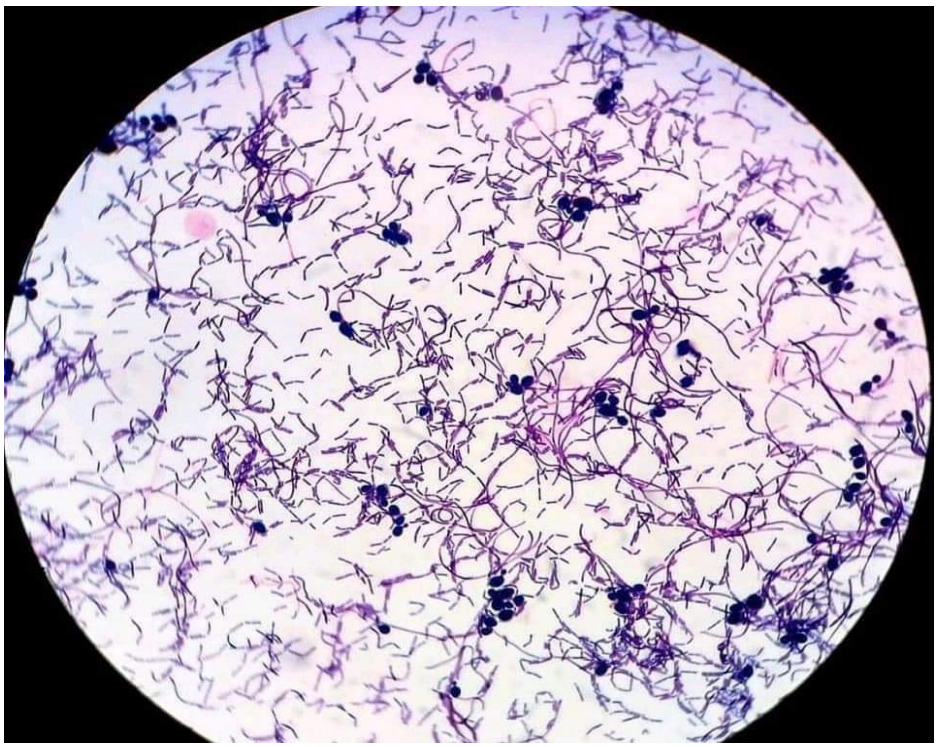


Рис. 7.1. Мікробіологічний препарат, зафарбований за Грамом

г) наступний крок – зафіксуйте мікроорганізми у полум'ї пальника (спиртівки). Для цього – тримаючи скло мазком нагору, тричі проведіть його через гарячу частину полум'я пальника. Щоб уникнути перегріву, час прямого впливу полум'я не повинний перевищувати 3-4 с.

Фіксація мікроорганізмів забезпечує прикріплення клітин до скла; робить мазок більш сприйнятливим до забарвлення, оскільки мертві клітини забарвлюються краще, ніж живі. Найпростіший і розповсюджений спосіб фіксації – це термічна обробка у полум’ї спиртівки або пальника.

Крім застосування жару, фіксацію можна робити хімічними речовинами, для цього використовують 96%-ний етиловий спирт (час фіксації 5-10 хвилин), ацетон (5 хвилин) та ін.

д) забарвлення – фіксований препарат помістіть мазком нагору на місток із двох паралельних скляних паличок, з'єднаних гумовими трубками, що знаходяться на стінках кювети чи кристалізатора. Нанесіть на нього 2-3 краплі барвника (кінець піпетки не повинний торкатися мазка!) на 2-3 хв.

Під час забарвлення розчин барвника на мазку не повинний підсихати, при необхідності долийте нові порції. Для одержання більш чистих препаратів барвник наливають на мазок, покритий фільтрувальним папером. Після обробки препарату барвником, його промивають водою доти, поки вода не стане безбарвною;

е) препарат промокніть фільтрувальним папером та висушіть при кімнатній температурі;

є) зафіксований та забарвлений препарат розгляньте за допомогою імерсійної системи мікроскопу.

ж) дослідження фіксованого препарату з імерсійним об'єктивом: сухий пофарбований препарат спочатку розгляньте із невеликим збільшенням під об'єктивом сухої системи (8×, 40×). Знайшовши найбільш вдале місце на ньому, препарат закріпіть клемами на предметному столику мікроскопа. Тубус мікроскопа підніміть і, повертаючи револьвер, установіть імерсійний об'єктив. Потім у центр препарату на мазок, не знімаючи його з предметного столика мікроскопу, нанесіть краплю імерсійної олії і, дивлячись збоку, обережно опустіть тубус мікроскопа до занурення об'єктива в олію. Стежте за тим, щоб фронтальна лінза не торкнулася предметного скла.

Після цього, дивлячись в окуляр, макрометричним гвинтом повільно підніміть об'єктив до появи у полі зору досліджуваного об'єкта. Фокус уточнюють за допомогою мікрометричного гвинта.

Після роботи імерсійну олію видаляють з об'єктива серветкою.

У правильно забарвленому і добре промитому препараті поле зору світле і чисте, а пофарбованими залишаються клітини мікроорганізмів.

Контрольні питання:

1. Які джерела забруднення повітря існують?
2. Назвіть види мікроорганізмів, що присутні у повітрі.
3. Опишіть методи контролю чистоти повітря, що застосовують на біотехнологічних підприємствах.
4. За допомогою яких мікробіологічних методів проводять дослідження повітря на підприємствах?
5. Які способи очищення та знезараження повітря існують?
6. Охарактеризуйте біологічне забруднення повітря.
7. Повітря як джерело розповсюдження інфекційних захворювань. Назвіть збудників різних інфекційних захворювань, що передаються повітряно-краплинним шляхом.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

«МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ МОЛОКА ТА БОРОШНА ЯК СИРОВИНИ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА»

***Мета роботи*:** освоїти методи мікробіологічного контроль молока та борошна, що застосовуються у біотехнологічних виробництвах.

Матеріали та обладнання: зразки молока; зразки борошна; колби, дистильована вода, пробірки, метиленовий синій, водяна баня, чашки Петрі, МПА, Сабуро, Ендо, дріжджовий екстракт, глюкоза, термостат, мікроскопи, предметні скельця, мікробіологічні петлі, барвники, спиртівка.

У результаті виконання лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- ✓ Знати та розуміти особливості різних біологічних продуцентів, види сировини, що застосовують;
- ✓ Знати та розуміти застосування біотехнологій у сучасній медико-фармацевтичній галузі та харчовій промисловості.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1.1.1. Загальна характеристика борошна як сировини у виробництві хлібобулочних виробів.

Борошно, яке використовується для виготовлення хлібопекарських виробів повинно відповідати чинним нормативним документам затвердженим підприємством виробником. На підприємство транспортують сировину автоборошновозами, додатково машину зважують автомобільними вагами для обліку борошна. Борошно надходить через щиток до силосів, де зберігається та використовується в подальшій роботі.

Температура зберігання сировини становить 10±2°С та відносній вологості 63±3%. Перед подачею борошна на виробництво здійснюється його вхідний контроль. Борошно визначають на показники якості і безпечності, які регламентуються чинними інструкція підприємством-виробником.

Лабораторія, під час надходження борошна, контролює ряд показників, а саме:

- фізико-хімічні,
- органолептичні,
- мікробіологічні показники на вимогу чинних нормативних документів.

Борошно може бути контаміноване різними мікроорганізмами, зокрема пліснявими грибами, такими як представники р. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, а також рядом бактерій. Наприклад, *B. subtilis* та *B. mesentericus* є причиною розвитку «картопляної» («тягучої») хвороби хліба. М'якуш хліба стає липким, тягучим, має неприємний запах. Зараження борошна відбувається у теплий період року під час зберігання.

1.1.2. Загальна характеристика молока — як біотехнологічної сировини.

Молоко та молочні продукти — є важливим компонентом здорового харчування людей в усьому світі. Молоко — це продукт нормальної фізіологічної секреції молочних залоз тварин, яке одержане за одне або

кілька доїнь, без додавання до нього інших добавок або вилучення певних складників.

При цьому молоко як сировина та продукти, що отримано з нього, є гарним поживним середовищем для розвитку ряду мікроорганізмів, у тому числі умовно-патогенних та патогенних, які є збудниками великої кількості тяжких інфекційних хвороб. Коли порушено санітарні умови одержання, зберігання та переробки молока, виготовлені молочні продукти можуть провокувати різних аліментарних захворювань. Тому, важливо проводити контроль якості молока та виготовлених з нього молочних продуктів.

А

Б

Ри

с. 8.1 — Біотехнологічна сировина: А — молоко; Б — борошно пшеничне

Мікробіологічний контроль продукції дозволяє дати об’єктивну оцінку якості та безпечності молочної продукції, а підвищення вимог до якісних та безпечних показників молока та молочних продуктів є дієвим та ефективним засобом удосконалення культури ведення молочного тваринництва.

Загалом якість та безпечність продуктів харчування, у тому числі й молока, визначається комплексом органолептичних, фізико-хімічних і мікробіологічних показників.

Під час видоювання молоко контамінується сапрофітною бактеріальною мікрофлорою, яка постійно знаходиться у дійковому каналі. Після видоювання молоко неодмінно забруднюється мікрофлорою з навколишнього середовища. Основними джерелами мікрофлори молока є, перш за все, стан приміщень в яких утримують корів, молочна залоза та шкіра тварини, корми та підстилка, гній, посуд, руки та одяг обслуговуючого персоналу, мухи і т. п.

Існує два шляхи забруднення коров'ячого молока мікроорганізмами – ендогенний та екзогенний. Джерело мікрофлори ендогенного походження – це молочна залоза корів, тобто мікроорганізми потрапляють у молоко ще у вимені тварин. Молоко утворюється в молочній залозі з речовин, які поступають з кров’ю. Кров здорової тварини стерильна і тільки у хворих на інфекційні захворювання особин з крові в молоко можуть потрапляти збудники інфекційних захворювань.

У 1 мл асептично отриманого молока міститься невелика кількість бактерій, яка може сягати до 600 − 900 КУО/мл. При неналежному догляді за вименем корів мікроорганізми зі шкіри надходять у внутрішні порожнини вимені та кількість бактерій у молоці збільшується, а в ньому крім мікрококів і стрептококів можуть зустрічатися бактерії групи кишкових паличок (БГКП), гнилісні бактерії тощо.

Джерелами мікрофлори молока екзогенного походження є шкіра тварини, підстилка, корми, вода, повітря, молочний посуд, руки і одяг працівників.

Найчастіше з молока та молочних продуктів виділяються мікобактерії, бруцели, лістерії, *S. aureus*, БГКП (*E. coli*) та сальмонели, що спричинюють розвиток інфекційних захворювань.

рис. 8.2 — Шкала кольору для визначання класу молока за редуктазною пробою (кількість мікроорганізмів, КУО/см^3)

Молоко коров'яче досліджують за наступними показниками:

- чистота,
- кислотність,
- густина,
- бактеріальне забруднення молока (за редуктазною пробою) (рис. 8.2),
- масова частку жиру, білка тощо.

Традиційні мікробіологічні методи контролю безпеки молока та молочних продуктів базуються на культивуванні мікроорганізмів на поживних середовищах і мають високу чутливість та селективність.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Завдання 1. Вивчіть наявність спор картопляної (*B. mesentericus*) та сінної паличок (*B. subtilis*) у дослідних зразках борошна, для цього:

а) розведіть досліджуване борошно (100 та 1000 разів) у стерильній водопровідній воді;

б) отриману суміш ретельно збовтайте та прогрійте на водяній бані при температурі 95-97°С протягом 10 хв з моменту появи першого пухирця.

Важливо! Прогрівання дозволить знищити вегетативні клітини мікроорганізмів, що можуть бути у дослідних зразках борошна, але спори при цьому залишаться життєздатними.

в) засійте із кожного розведення борошна по 1,0 мл на поживні середовища МПА та Сабуро.

г) дослідні чашки Петрі із поживним середовищем МПА помістіть у термостат при температурі 37°С на 1-3 доби, із середовищем Сабуро – при температурі 26-28°С на 5-7 діб.

Завдання 2. На наступному лабораторному занятті оцініть результати проведеного дослідження та зробіть висновки:

а) підрахуйте кількість КУО/мл, що виросли на дослідних чашках Петрі;

б) опишіть культуральні властивості колоній, що сформувалися на чашках Петрі;

в) із колоній, що виросли, приготуйте мікробіологічні препарати, зафарбуйте їх за Грамом та розгляньте за допомогою імерсійної системи мікроскопа, зафіксуйте побачене у лабораторному зошиті.

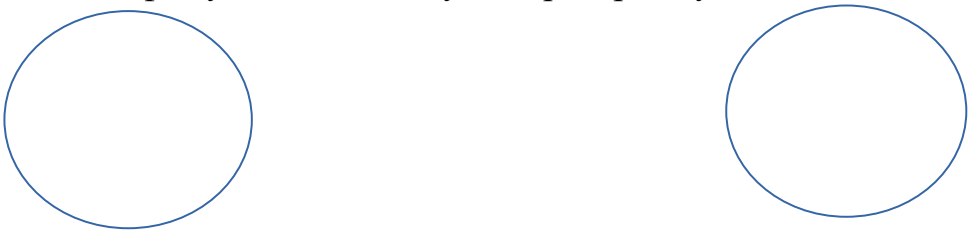


Рис. _____

г) зробіть висновки щодо якості дослідних зразків борошна та заповніть таблицю. 8.1.

Таблиця 8.1 — Мікробіологічні показники дослідних зразків борошна

	Кількість КУО/мл			
Дослідний зразок	**МПА**		**Сабуро**	
	1	**2**	**1**	**2***
1				
2				
3.....				

* — розведення

Завдання 3. Вивчіть дослідні зразки молока за допомогою редуктазної проби з метиленовим синім.

Метод ґрунтується на відновленні метиленового синього окисно-відновлювальними ферментами мікроорганізмів, що наявні в продукті. За тривалістю знебарвлення метиленового синього визначають бактеріальне забруднення сирого молока.

Для проведення досліду необхідно:

а) приготувати розчин метиленового синього для редуктазної проби з концентрацією метиленового синього 0,005 г/ см^3 (0,5 г метиленового синього переносять у мірну колбу на 100 мл і доводять до мітки кип’яченою та охолодженою до (25 ± 2) °С дистильованою водою, суміш ретельно

перемішують до повного розчинення). *Строк зберігання готового розчину — не більше ніж 12 міс. у ємностях, захищених від світла.*

б) У пробірки внести по 1 мл робочого розчину метиленового синього, та 2 мл дослідної проби молока, закрити гумовими корками та перемішати, перевертаючи пробірки тричі;

в) Пробірки помістіть на водяну баню, яку переносять у термостат за температури 37 °С, при цьому рівень води у водяній бані, після занурювання пробірок з молоком має доходити до рівня рідини в пробірці або бути дещо вищим. Температура води має бути 37 °С упродовж усього часу дослідження.

г) Коли проба знебарвлюється, дослідний контроль завершують. Злегка забарвлений кільцеподібний шар зверху (товщиною не більше ніж 1 см) або невелику забарвлену частину знизу пробірки після знебарвлення проби не беруть до уваги.

д) Врахуйте отримані результати з огляду на таблицю 8.2:

Таблиця 8.2 — Ступінь бактеріального забруднення за тривалістю знебарвлення молока з метиленовим синім

Тривалість знебарвлення, год	**Орієнтовна кількість бактерій в 1 мл молока, КУО**
Від 5 год та більше	До 100 тис.
Від 2 год до 5 год	До 300 тис.
Від 30 хв до 2 год	До 500 тис.
До 30 хв	До 3 млн

Завдання 4. Визначте кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (КМАФАнМ).

Мезофільні аеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми здатні розмножуватися на селективних твердих поживиних середовищах за температури 30°С протягом 72 год.

Зверніть увагу! *Кількість продукту, який використовують для висівання, визначають за ступенем найвірогіднішого мікробного забруднення відповідно до чинних нормативних документів на продукти або сировину. Для того щоб отримати достовірні результати, розведення має бути таке, щоб забезпечити утворення від 10 до 150 колоній на одній чашці Петрі.*

а) виконайте десятикратні розведення дослідних зразків молока;

б) приготуйте наступне поживне середовище:

Склад: сухий поживний агар — 35,0 г; екстракт дріжджовий — 2,5 г; глюкоза — 1,0 г; вода дистильована — до 1000 мл.

Компоненти розчиняють у воді в такій послідовності: дріжджовий екстракт, глюкоза. Додають сухий поживний агар і, безперервно перемішуючи, нагрівають до кипіння або тримають над парою протягом 30 хв до повного розчинення агару. За необхідності фільтрують через фільтрувальний папір.

в) у кожну стерильну чашку Петрі внесіть відповідне розведення певного дослідного зразка молока та залийте 10-15 мл розплавленого та охолодженого до 40—45 °С поживного середовища, ретельно перемішайте

легким коловим похитуваннями для рівномірного розподілу посівного матеріалу в середовищі;

г) засіяні чашки залишити при кімнатній температурі до повного застигання, після чого помістіть у термостат за температури 30 °С на 72 год.

Важливо! Колонії, що злиті розглядають як одну. Якщо такий характер росту спостерігають менше ніж на одній чверті чашки, то підраховують колонії на вільній частині чашки та обчислюють їх відповідну кількість для всієї площі. Якщо злиті колонії займають більше однієї чверті чашки, то таку чашку не використовують.

д) підрахуйте колонії у чашках Петрі, що виросли, приготуйте з них мікробіологічні препарати, зафарбуйте за Грамом і розгляньте за допомогою імерсійної системи, зробіть висновки.

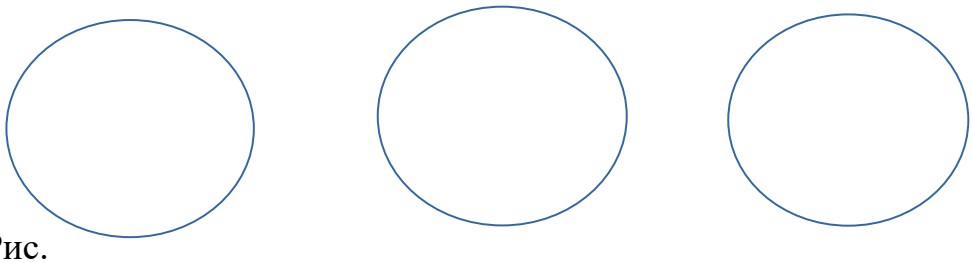


Рис. _____

Завдання 5. На середовище Ендо у чашки Петрі засійте по 1 мл дослідного розведення молока та перенесіть у термостат при 37ºС на 24 год, оцініть результати та зробіть відповідні висновки.

Чи спостерігався ріст колоній на даному поживному середовищі?

Контрольні питання:

1. Назвіть основні сфери застосування борошна у біотехнології.
2. Охарактеризуйте молоко як сировину у біотехнологічному виробництві?
3. Назвіть джерела контамінації борошна. Які збудники можуть вражати зерно?
4. Перелічіть шляхи контамінації молока. Які основні показники, що свідчать про його якість?
5. Збудником яких інфекційних хвороб людини може бути молоко?
6. Які методи визначення якості молока застосовують на виробництві?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

«ВПЛИВ ЛАКТОБАЦИЛ НА БІОПЛІВКОУТВОРЮЮЧІ ШТАМИ»

Мета: дослідити вплив лактобацил на біоплівкоутворюючі штами бактерій.

Матеріали та обладнання: стерильна водопровідна вода, МПА, МПБ, MRS, пробірки, ексикатор, свічка, центрифуга, чашки Петрі, мікроскоп, набір для фарбування за Грамом, предметні скельця.

У результаті виконання лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- ✓ Знати та розуміти особливості різних біологічних продуцентів, види сировини, що застосовують;
- ✓ Знати та розуміти застосування біотехнологій у сучасній медико-фармацевтичній галузі та харчовій промисловості.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Лактобацили є складовою частиною мікробіому шлунково-кишкового тракту, ротової порожнини та піхви людини. Вони здійснюють позитивний вплив на здоров'я внаслідок прямої взаємодії, що відбувається між клітинами і опосередкованої — через синтез метаболітів, що робить їх придатними для використання у якості пробіотиків. У зв’язку з цим, пошук нових штамів лактобацил, які виявляють пробіотичні властивості та їх застосування є актуальним питанням сучасної медицини, що пов’язано зі значним поширенням різних дисбактеріозів серед населення.

Також, великою проблемою є активне зростання стійкості мікроорганізмів до антибіотиків та здатність ними формувати біоплівки (рис. 9.1).

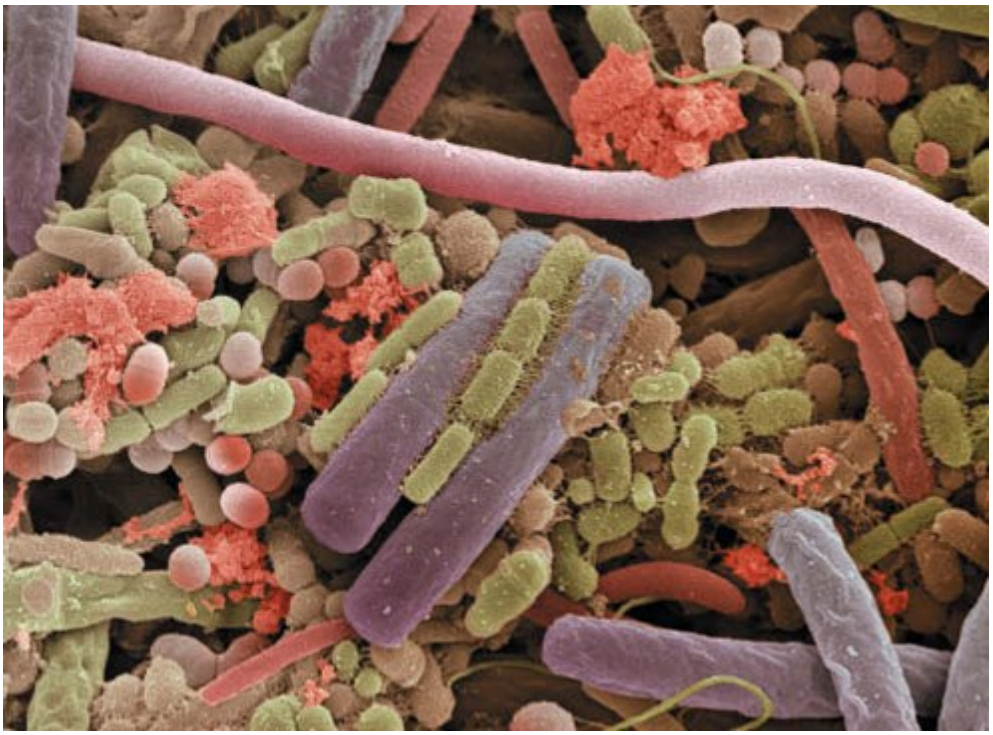


Рис. 9.1 — Мікрофотографія бактеріальної спільноти з язика (скануюча мікроскопія)

Як наслідок — це провокує інфекційні захворювання, що важко піддаються антибіотикотерапії та лікуванню. У складі біоплівки бактерії та інші мікроорганізми є захищеними від негативних факторів навколишнього середовища — імунного захисту, антибіотиків та інших препаратів.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Увага! Під час роботи дотримуйтеся умов стерильності за допомогою асептичних заходів та відкритого вогню спиртівки.

Завдання 1. Підготуйте **48-год культури лактобацил**, вирощені у мікроаерофільних умовах на рідкому поживному середовищі MRS:

а) у стерильні пробірки розлити по 5 мл стерильного MRS та засіяти добові культури лактобацил;

б) помістити засіви у ексикатор (у центр ємності поставити та запалити свічку), краї посудини змастити олією та накрити кришкою;

в) ексикатор перемістити до термостату.

Завдання 2. Підготуйте добові культури біоплівкоутворюючих штамів бактерій.

Завдання 3. Отримайте супернатанти шляхом центрифугування 48-год культур лактобацил, вирощених у мікроаерофільних умовах на рідкому поживному середовищі MRS.

Завдання 4. Перевірте вплив супернатантів лактобацил на біоплівкоутворюючі штами бактерій:

а) змішати добові культури дослідних штамів ($1{,}0\times10^6$ КУО/мл) з отриманими супернатантами у співвідношенні 1:1;

Контрольні пробірки:

- замість супернатанту до дослідної культури додати стерильний ізотонічний розчин;
- у пробірки з супернатантом замість біоплівкоутворюючого штаму внести ізотонічний розчин.

б) дослідні пробірки помістити у термостат при 37º С;

в) через добу провести висів на тверде поживне середовище (МПА) для визначення кількості КУО/мл біоплівкоутворюючих бактерій.

Завдання 5. На наступному лабораторному занятті підрахуйте результати та зробіть висновки: із колоній, які виросли на МПА приготуйте мікробіологічні фіксовані препарати та розгляньте під мікроскопом, застосовуючи імерсійну систему. Усі спостереження замалюйте у зошит для лабораторних робіт.

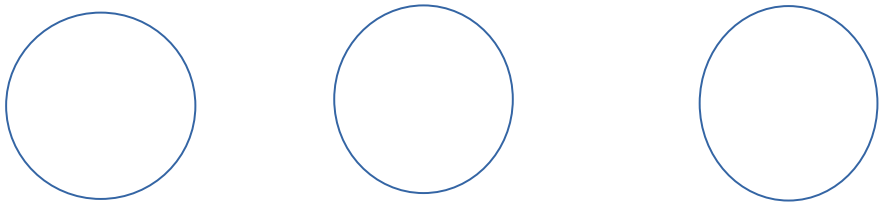


Рис. _____

У висновках вкажіть та обґрунтуйте — чи виявили ефективність проти бактерій отримані супернатанти лактобацил?

Контрольні питання:

1. Яке значення лактобацил у сучасній біотехнології?
2. Що таке пробіотики та з якою метою їх застосовують?
3. Які джерела пробіотичних штамів існують? Опишіть складнощі роботи з ними.
4. Наведіть форми пробіотичних препаратів та приклади.
5. Продемонструйте блок-схему виробництва пробіотичного препарату.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

«ЛАБОРАТОРНІ ТА ПРОМИСЛОВІ БІОРЕАКТОРИ»

Мета роботи: ознайомитися з різними типами біореакторів, які використовуються у біотехнологічних промислових процесах та в умовах лабораторії.

***Матеріали та обладнання*:** презентація, роздатковий матеріал.

У результаті виконання лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- ✓ Знати та розуміти вплив фізичних факторів, неорганічних і органічних речовин на живі організми різних рівнів організації: бактерії, гриби, віруси, культури клітин тканин тварин або рослин та навколишнє середовище.
- ✓ Знати та розуміти особливості різних біологічних продуцентів, види сировини, що застосовують

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Біореактори (ферментери) – це спеціальні резервуари, якими оснащуються біотехнологічні процеси та які застосовуються для культивування біопродуцентів з метою отримання їх біомаси або синтезу біологічно-цінних метаболічних сполук (продуктів обміну). Вони відрізняються від хімічних реакторів тим, що крім етапів завантаження субстратів, їх перетворення, відділення та очищення цільового продукту, у цих біосистемах реалізація процесів проходить за принципами поетапного збільшення об'єму апарату (принцип масштабування), однорідності фізико-хімічних умов (температури, pH середовища субстрату, концентрації розчинених речовин, кисню та інших газів). Суттєво відрізняються і процеси масообміну (між газовою та рідинною фазами).

Сучасний біореактор повинен включати наступні взаємопов'язані системи (рис. 9.1):

– антикорозійного покриття;

– ефективного перемішування та гомогенізації субстрату;

– забезпечення доступу та швидкої дифузії газоподібних агентів (аерація середовища, забезпечення O_2);

– теплообміну (підтримання температурного режиму);

– піногасіння;

– стерилізації середовища, обладнання та повітря;

– контролю та регуляції процесу.

За цільовим призначенням біореактори класифікуються на:

– лабораторні (міні) від 0,5 л до 1 м^3;

– пілотні (дослідно-промислові) 10-100 м^3;

– промислові 1000 м^3 та більш.

Лабораторні, пілотні та промислові реактори відрізняються за умовами тепло-, масообміну та перемішування.

Рис. 9.1 Біореактори, що використовують на сучасних виробництвах

Лабораторні та пілотні біореактори – це пошуковий шлях. На кожному з етапів проводиться нарощування масштабу біотехнологічного процесу (принцип масштабування), вирішуються завдання з налагодження та оптимізації біотехнології (рис.9.2).

Рис. 9.2. Лабораторний біореактор для глибинного культивування

Важливу роль при культивуванні біомаси відіграє безперервне перемішування, яке забезпечує потрібну аерацію. У лабораторних умовах перемішування досягається при застосуванні качалочних та ролерних установок, у промислових – за допомогою багатоярусних мішалок (рис.9.3).

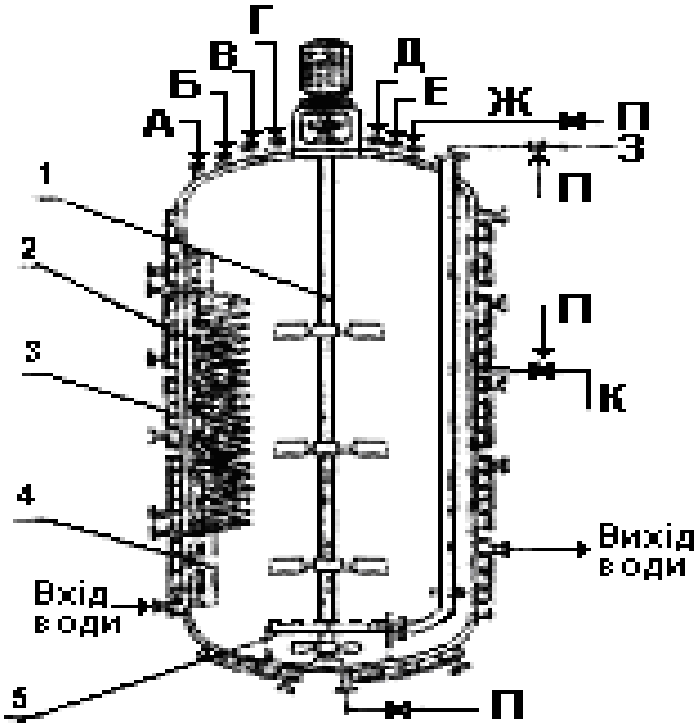


Рис. 9.3. Ферментатор періодичної дії:
А – завантажувальна лінія;
Б – видалення відпрацьованого повітря; В – подача стерильного стиснутого повітря;
Г – подача пару; Д – лінія подачі додаткових речовин;
Е – подача піногаснику;
Ж – подача мийного розчину;
З – подача повітря у барботер;
К – відбір проб; П – пара
1 – турбінна трирядна мішалка;
2 – змійовик; 3 – секційна охолоджувальна сорочкка;
4 – відбиваюча перегородка;
5 – барботер

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Завдання 1. Розгляньте різні види біореакторів: промислові: ферментатор періодичного і безперервного культивування та інші, лабораторні: термостат, качалочні установки, ферментери на невеликий об’єм.

Завдання 2. Схематично у зошиті для лабораторних робіт замалюйте приклади промислових та лабораторних біореакторів. Позначте основні частини біотехнологічних реакторів.

Завдання 3. Наведіть особливості біореакторів у таблиці 9.1:

Таблиця 9.1 — Загальна характеристика ферментерів різного призначення

Види біореакторів	Біотехнологічні призначення	Схема конструкції з позначеннями
Лабораторні: (навести приклади)		
Промислові: (навести приклади)		

Завдання 4. Підберіть, з огляду на особливості виробництва, ферментери, що можуть використовуватися з метою отримання пробіотичних препаратів, антибіотиків, йогуртів та ряжанки.

Контрольні питання:

1. Назвіть принципи оснащення біотехнологічних виробництв.
2. Що таке біопошкодження?
3. Охарактеризуйте системи біореакторів та їх призначення.
4. Наведіть класифікацію біореакторів за принципом перемішування.
5. Які принципи масштабування біотехнологічних процесів існують?
6. Класифікація біореакторів за умовами культивування.
7. Наведіть приклади біореакторів.
8. Яке призначення системи аерації у ферментерах?
9. Назвіть призначення системи перемішування та теплообміну.
10. Опишіть особливості дотримання асептики у біотехнології.
11. Як працює система контролю у біореакторах?

КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ

Навчальні досягнення здобувачів вищої освіти за результатами вивчення курсу оцінюватимуться за шкалою, що наведена нижче:

Рейтингова шкала	Інституційна шкала
90 – 100	відмінно
74-89	добре
60-73	задовільно
0-59	Незадовільно

Здобувачі вищої освіти можуть отримати **підсумкову оцінку** з навчальної дисципліни на підставі поточного оцінювання знань за умови, якщо набрана кількість балів складатиме не менше **60 балів.**

Максимальне оцінювання:

Теоретична частина	Практична частина		**Разом**
	При своєчасному складанні	При несвоєчасному складанні	
60	40	30	**100**

Лабораторні заняття оцінюються якістю виконання та захисту лабораторних робіт.

Теоретична частина оцінюється за результатами опитування, що містить 5 відкритих запитань.

Критерії оцінювання підсумкової роботи

Відкриті запитання оцінюються шляхом співставлення з еталонними відповідями. За кожне питання здобувач отримує **12 балів (разом 60 балів).**

Критерії оцінювання лабораторної роботи

За кожну лабораторну роботу здобувач вищої освіти може отримати наступну кількість балів:

4 бали: виявлено підвищений рівень засвоєння обсягу знань і набуття навичок; якісно, ретельно, самостійно та в повному обсязі виконано завдання лабораторної роботи. Матеріал викладено в логічній послідовності, без мовних помилок, а власні висновки студента відповідають темі лабораторного завдання.

3 бали: показано оволодіння достатнім обсягом знань та навичок під час виконання лабораторної роботи; продемонстровано самостійність при оформленні завдання, але з незначними неточностями; а власні висновки студента відповідають темі лабораторної роботи.

3-2 бали: недостатньо показано оволодіння обсягом знань і навичок під час виконання лабораторної роботи; у роботі зафіксовані помилки, а власні висновки студента не завжди є логічними та відповідають темі лабораторної роботи.

2 бали: лабораторну роботу виконано; нечітко та нелогічно викладено результати та сформовано висновки, але продемонстровані знання та навички у межах навчальної програми.

1 бал: не виконано лабораторну роботу у повному обсязі та наведено неправильні результати, до яких не надано жодних пояснень та не сформовано висновки.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дігтяр С.В. Галузі сучасної біотехнології : підручник для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Дігтяр С. В., Єлізаров М. О., Мазницька О. В., Никифорова О. О., Новохатько О. В., Пасенко А. В., Сакун О. А. Загальна редакція професора Никифорова В. В. – Кременчук: ПП Щербатих О.В., 2021 – 184 с.

2. Капрельянц Л. В. Теоретичні основи біотехнології: навч. посібник / Л.В. Капрельянц. – Харків: Факти, 2020. – 291 с. 15

3. Лобова О.В. Біотехнології: навч. посібник. / О.В. Лобова, А.С. Левішко, І.І. Гуменюк. – Київ : Видавництво НУБіП України, 2021. – 548 с

4. Краснопольський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє: навч. посіб. / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : Мадрид, 2022. – 151 с.

5. Пирог Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник / Т.П. Пирог, Ю.М. Пенчук – Київ : Ліра-К, 2019. – 258с.

6. Пляцук Л.Д. Екологічна біотехнологія: принципи створення біотехнологічних виробництв: навчальний посібник / Л. Д. Пляцук, Є. Ю. Черниш. – Суми : Сумський державний університет, 2018. – 293 с.

7. Сучасні тенденції розвитку біотехнологій в біології та фармації: навч.-методич. посіб. / укл. Тугай Т. І., Поєдинок Н.Л., Сергійчук Н. М., Катинська М. Г. – Київ : «Талком», 2019. – 125 с.

8. Швед О. В. Екологічна біотехнологія: навчальний посібник: кн. 1 / О. В. Швед, Р. О. Петріна, О. З. Комаровська-Порохнявець, В. П. Новіков. – Львів: Видавництво Львівської політехніки, 2018. – 424 с.

9. Швед О. В. Екологічна біотехнологія: навчальний посібник: кн. 2 / О. В. Швед, Р. О. Петріна, О. З. Комаровська-Порохнявець, В. П. Новіков. – Львів: Видавництво Львівської політехніки, 2018. – 368 с.

ЗМІСТ

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ ……. 3

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У ЛАБОРАТОРІЇ …….. 5

Лабораторна робота № 1. Правила техніки безпеки у біотехнологічній лабораторії. Лабораторний посуд та устаткування…….. 6

Лабораторна робота № 2. Основні стадії біотехнологічного виробництва та різновиди біотехнологічних процесів……. 9

Лабораторна робота № 3. Віруси та бактеріофаги – біопродуценти біотехнологічних виробництв …… 19

Лабораторна робота № 4. Гриби, водорості та лишайники як біопродуценти біотехнологічних процесів…… 23

Лабораторна робота № 5. Найпростіші та вермикультура у біотехнологічному виробництві……. 29

Лабораторна робота № 6. Поживні середовища, що застосовують у біотехнології……. 32

Лабораторна робота № 7. Контроль якості повітря на підприємствах біотехнологічної промисловості……. 36

Лабораторна робота № 8. Мікробіологічний контроль якості молока та борошна як сировини для біотехнологічного виробництва……. 41

Лабораторна робота № 9. Вплив лактобацил на біоплівкоутворюючі штами..... 47

Лабораторна робота № 10. Лабораторні та промислові біореактори 50

КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ……. 54

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ…….. 56

Навчальне видання

Сідашенко Ольга Ігорівна
Федотов Вячеслав Вікторович

ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт
для здобувачів ступеня бакалавра
освітньо-професійної програми «Біологія»
зі спеціальності 091 (Е1) Біологія та біохімія

Видано в авторській редакції

Електронний ресурс.
Підписано до видання31.12.2025. Авт. арк. 4,1.

Національний технічний університет «Дніпровська політехніка»
49005, м. Дніпро, просп. Д. Яворницького, 19