

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 «Технології захисту навколишнього
середовища»
зі спеціальності 183 Технології захисту навколишнього середовища

Дніпро
НТУ «ДП»
2024

Сідашенко О.І.

Основи біотехнології [Електронний ресурс] : методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для здобувачів ступеня бакалавра освітньо-професійної програми «Технології захисту навколишнього середовища» зі спеціальності 183 Технології захисту навколишнього середовища / О.І. Сідашенко, В.В. Федотов ; М-во освіти і науки України, НТУ «Дніпровська політехніка». – Дніпро : НТУ «ДП», 2024. – 53 с.

Автори:

О.І. Сідашенко, канд. біол. наук, доц.,

В.В. Федотов.

Затверджено науково-методичною комісією зі спеціальності 183 Технології захисту навколишнього середовища (протокол № 7 від 03.12.2024 р.) за поданням кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища (протокол № 5 від 03.12.2024 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 183 Технології захисту навколишнього середовища та закріплення практичних навичок у засвоєнні дисципліни «Основи біотехнології».

Відповідальна за випуск завідувачка кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища Борисовська О.О., 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 з різних напрямків біотехнологічної галузі для вирішення харчових, медичних та природоохоронних задач у виробничій сфері 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;
- Знати, розуміти та визначати основні параметри біотехнології і вміти їх застосовувати для вирішення природоохоронних задач; обґрунтовувати та використовувати біотехнології для захисту об'єктів довкілля, у ветеринарії, сільському господарстві, медицині тощо.

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У ЛАБОРАТОРІЇ

Загальні правила роботи у лабораторії

1. У лабораторії повинна дотримуватися 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 розповсюдженню біооб'єктів поза лабораторного приміщення і захищають 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 біотехнологічній 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 основні терміни, теорії, концепції, закони у галузі біології та споріднених наук і вміти їх застосовувати.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії

1. Лабораторні роботи необхідно виконувати у спецодязі (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 здійснюються 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).



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, які приміщення 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 кисло-молочних 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 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, розуміти та визначати основні параметри біотехнології і вміти їх застосовувати для вирішення природоохоронних задач; обґрунтовувати та використовувати біотехнології для захисту об'єктів довкілля, у ветеринарії, сільському господарстві, медицині тощо.

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).

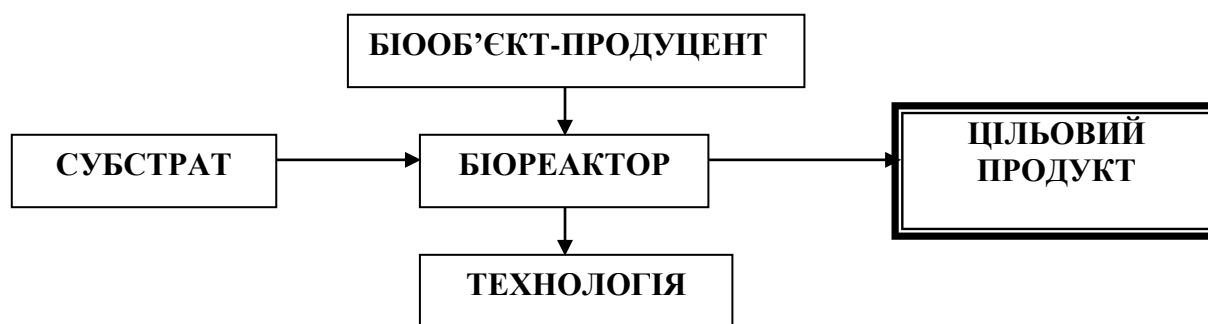


Рис. 2.2. Блок-схема біотехнологічного процесу

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, ізолюваних 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);

- *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);

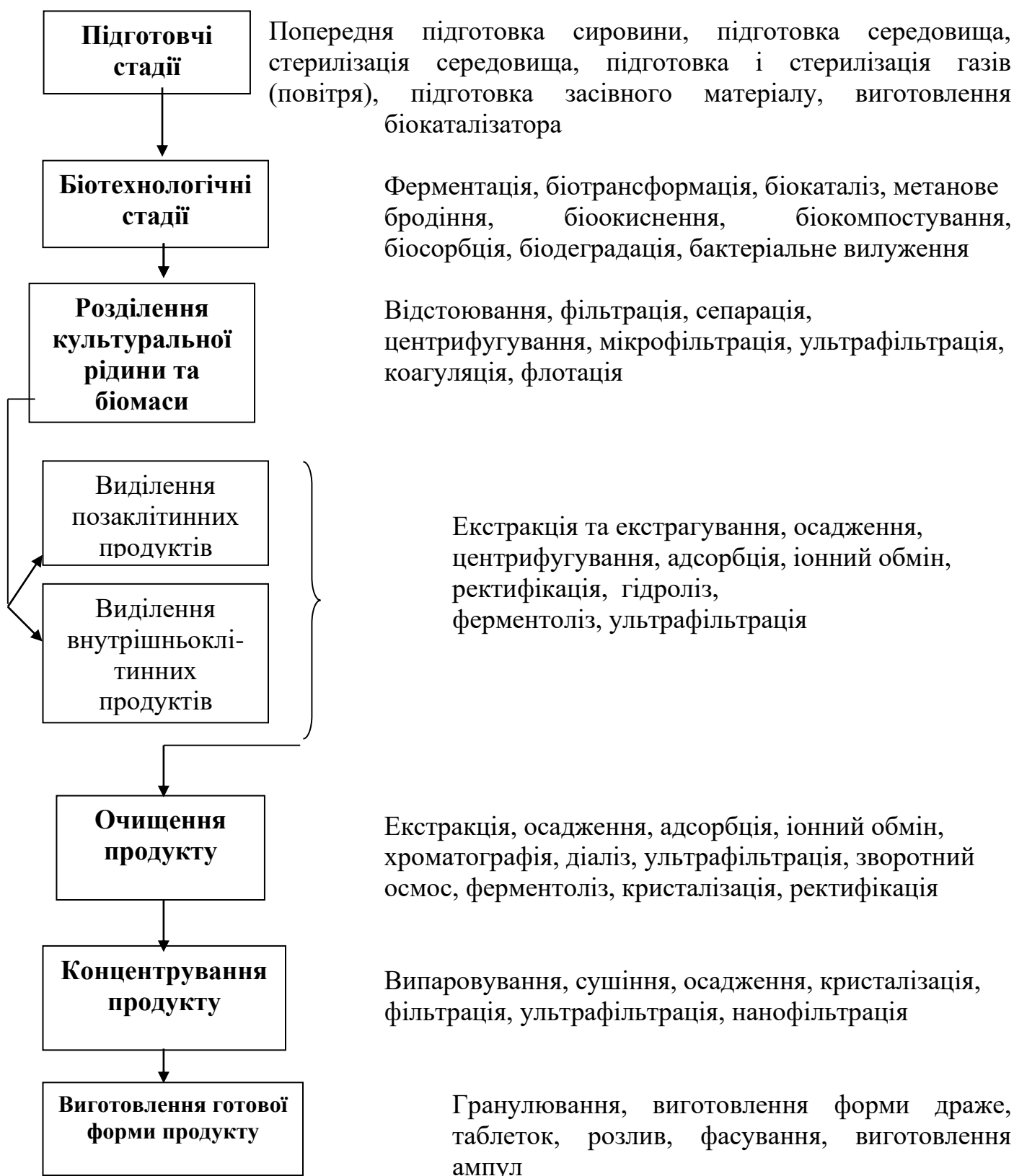


Рис. 2.3. Узагальнена схема основних стадій біотехнологічного виробництва

– *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 імуотропних 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);



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

– 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);

– 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 (грунту, 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 В₂ можна розглянути на рис. 2.5.



Рис. 2.5. Ріст колоній на різних середовищах

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.)

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 -196°C), що запобігає змінам генофонду; комбіновані методи.



Рис. 2.6. Вакуум-сушильна установка

Одним із ефективних методів збереження готової продукції, який широко застосовується 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 процес	Коротка характеристика	Приклади впровадження біотехнологічного процесу
Ферментація		
Біотрансформація		
Біокаталіз		
Біоокиснення		
Метанове бродіння		
Біокомпостування		
Біосорбція		
Біодеградація		
Бактеріальне вилуження		

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

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

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

p. 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.

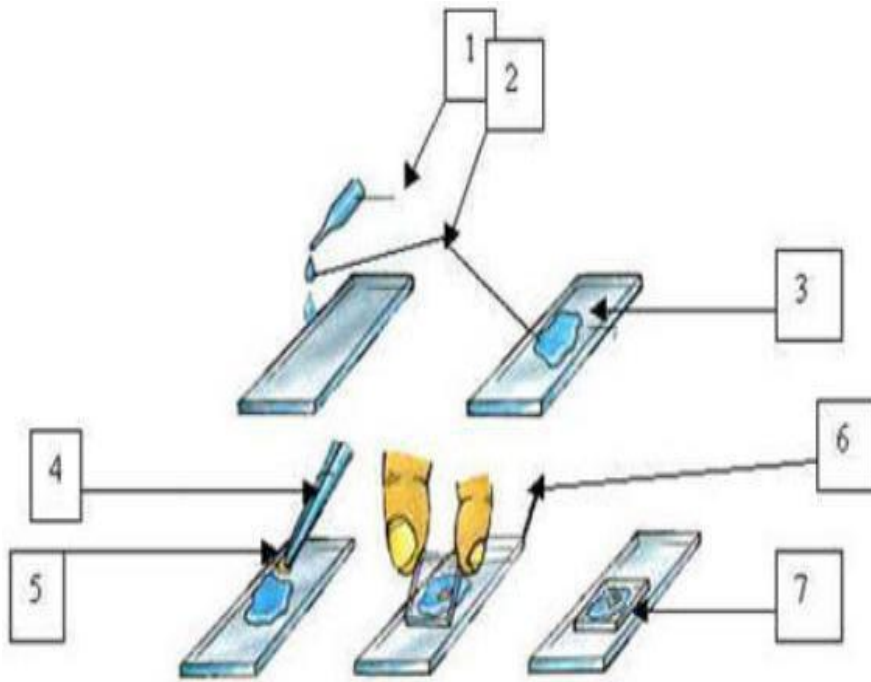


Рис. 2.7. Виготовлення препарату «роздавлена крапля».

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 замалуйте у зошиті для лабораторних робіт.

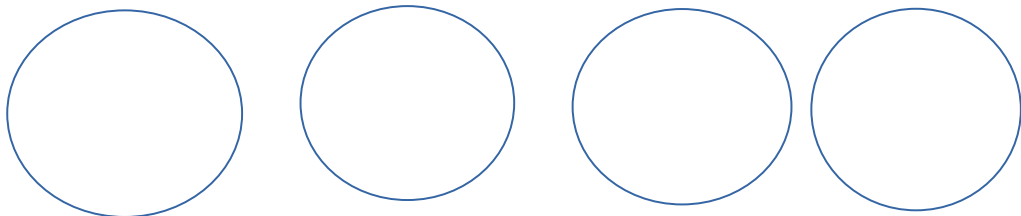


Рис. _____ (підписати)

- 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 біопродукти, 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 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.

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.

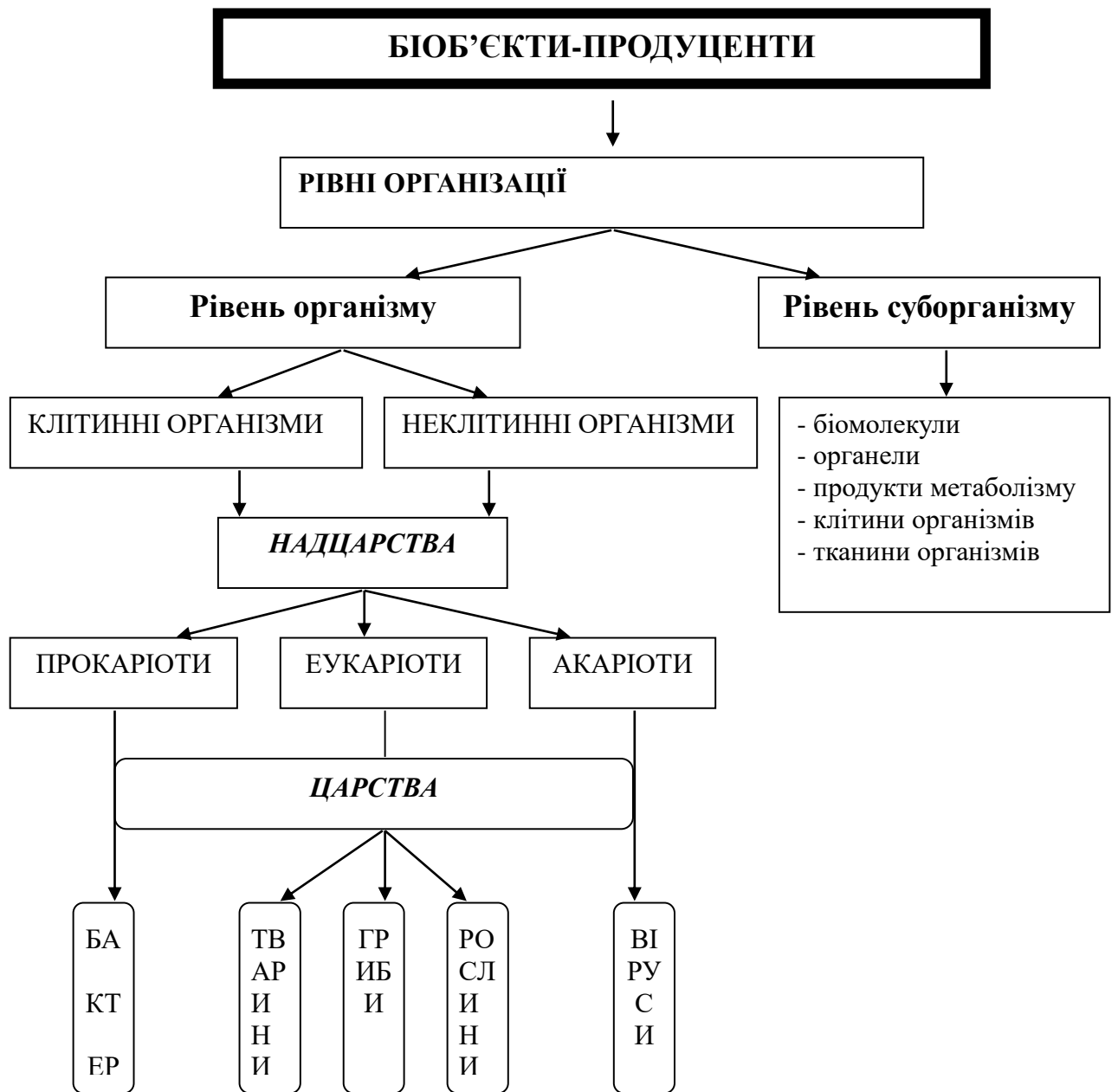


Рис. 3.1. Характеристика біопродуцентів за рівнями організації

На рисунку 3.2 можна розглянути культуру клітин тканин під мікроскопом:

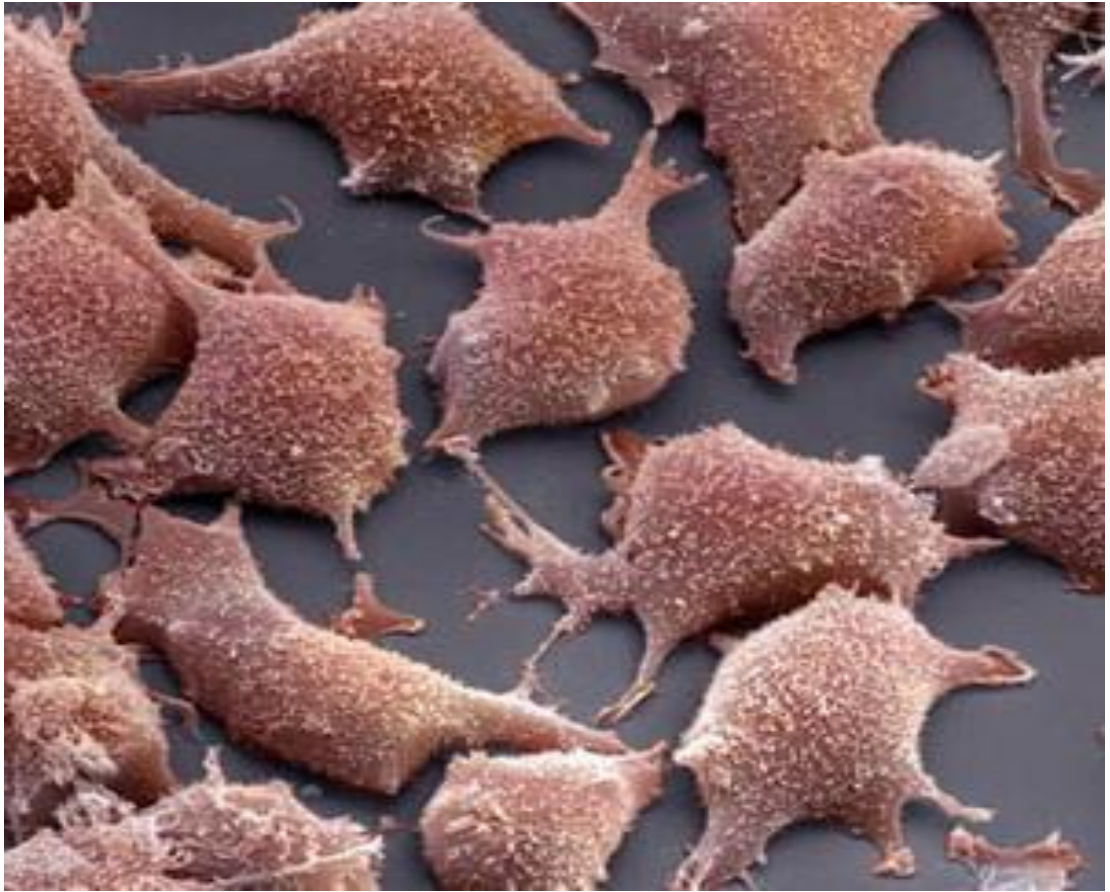


Рис. 3.2. Культура клітин тканин

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) – біоб'єкти, які не мають клітинної будови, містять тільки один тип нуклеїнових кислот: або молекулу РНК – рибовіруси, або молекулу ДНК – дезоксिवіруси ($\approx 10^3$ нуклеотидів або пар нуклеотидів). Віруси є облігатними паразитами та характеризуються дуже малими розмірами. Їх діаметр вимірюється 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.

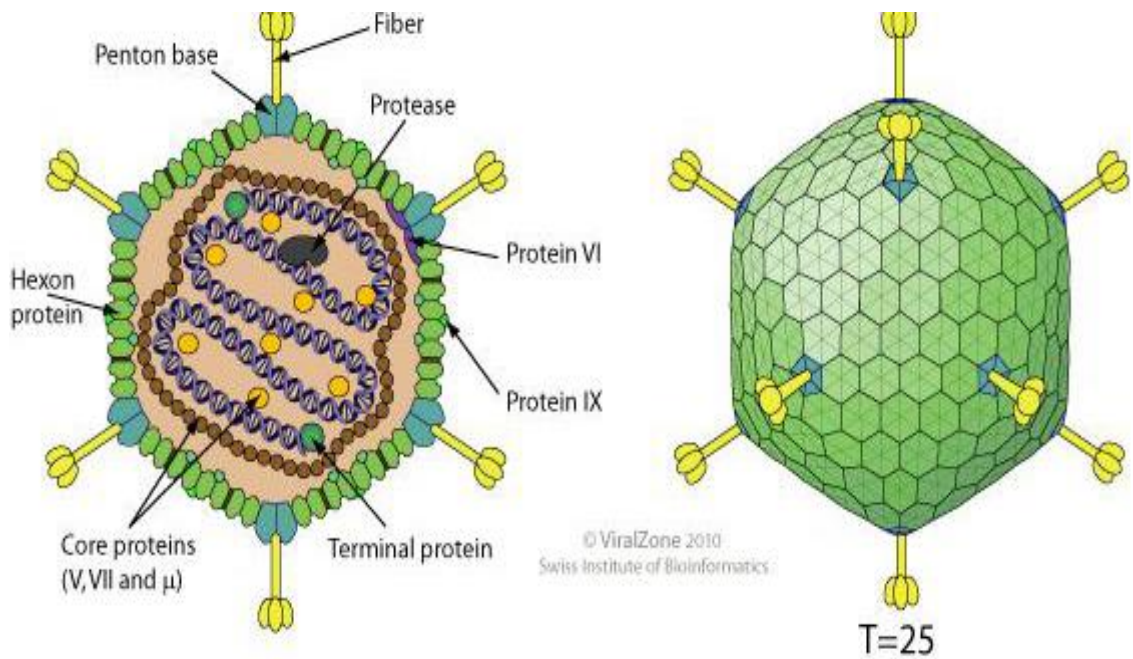


Рис. 3.3. Схема будови віріона аденовірусів

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.

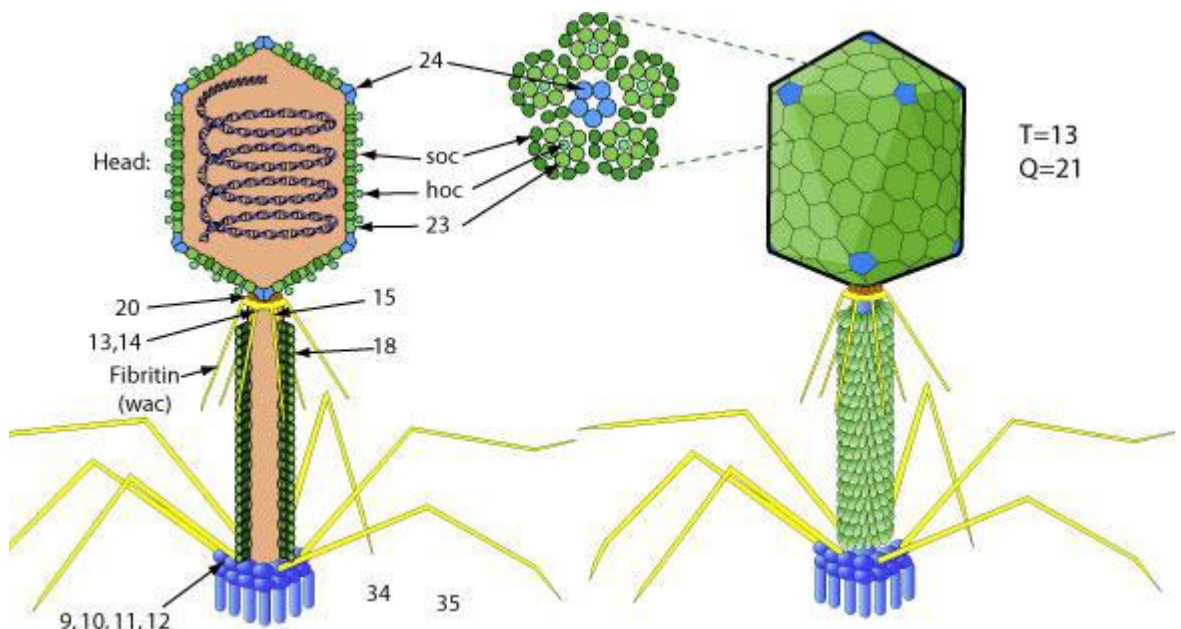


Рис. 3.4. Схематична будова віріона фага з родини міовірусів

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 cerevisiae*, чашки Петрі з

цвілевими грибами (*Mucor*; *Penicillium*; *Aspergillus* тощо), одноклітинні водорості.

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

- ✓ Знати та розуміти особливості різних біологічних продуцентів.
- ✓ Знати, розуміти та визначати основні параметри біотехнології і вміти їх застосовувати для вирішення природоохоронних задач; обґрунтовувати та використовувати біотехнології для захисту об'єктів довкілля, у ветеринарії, сільському господарстві, медицині тощо.

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 (β -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 *a* і *b*, каротиноїди та крохмаль. Деякі види мають джгутики. Нестатеве розмноження відбувається зооспорами, вегетативно, поділом навпіл або брунькуванням. Статевий процес відбувається у формі гологамії та мерогамії.

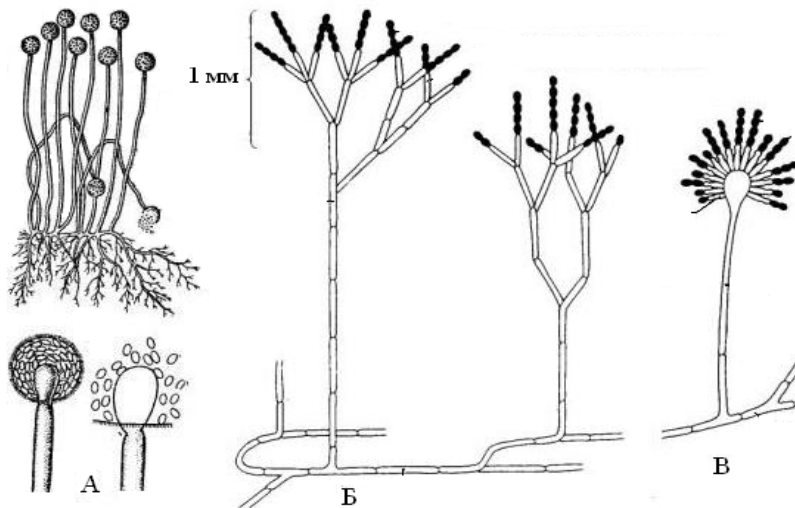
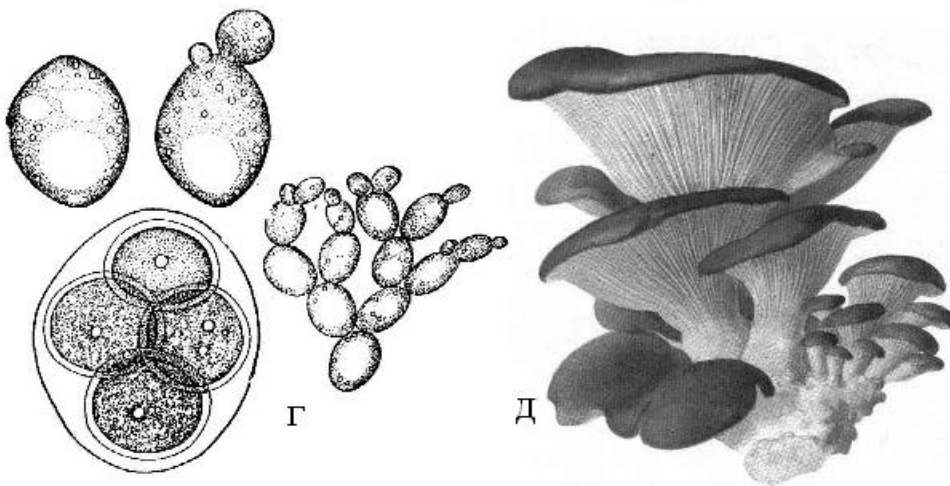


Рис. 4.1. Мікроміцети та макроміцети:

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 симбіотичні організми, які утворені грибом – гетеротрофним мікобіонтом (переважно аскоміцетами, іноді базидіоміцетами) 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;

- листові – тіло у вигляді листовидних 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 (грунту) 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.

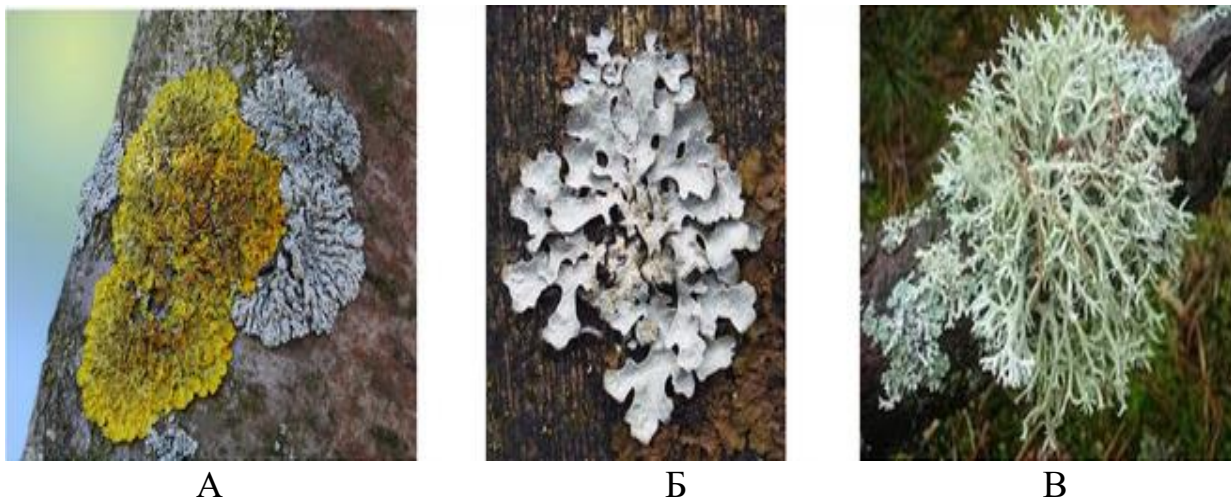


Рис. 4.3. Морфологічні групи лишайників:
А – накипний; Б – кущовий; В – листуватий

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 виростили 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 розмноження, утворення і проростання спор тощо. Технологія приготування:

а) невелику краплю суспензії мікроорганізмів нанесіть на покривне скло,

б) переверніть його краплю 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 спостереження 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 виростили 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.

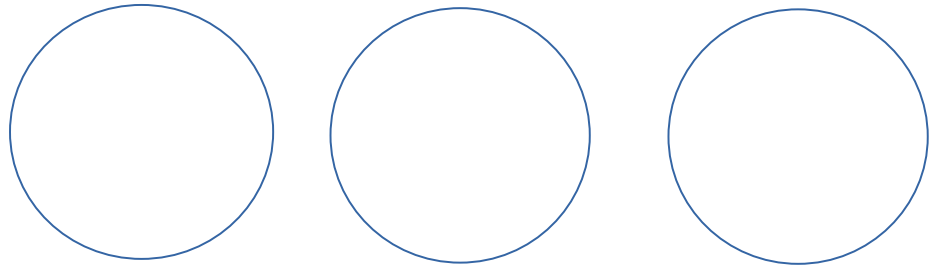


Рис. _____

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;
- ✓ Знати, розуміти та визначати основні параметри біотехнології і вміти їх застосовувати для вирішення природоохоронних задач; обґрунтовувати та використовувати біотехнології для захисту об'єктів довкілля, у ветеринарії, сільському господарстві, медицині тощо.

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 – евгена 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.

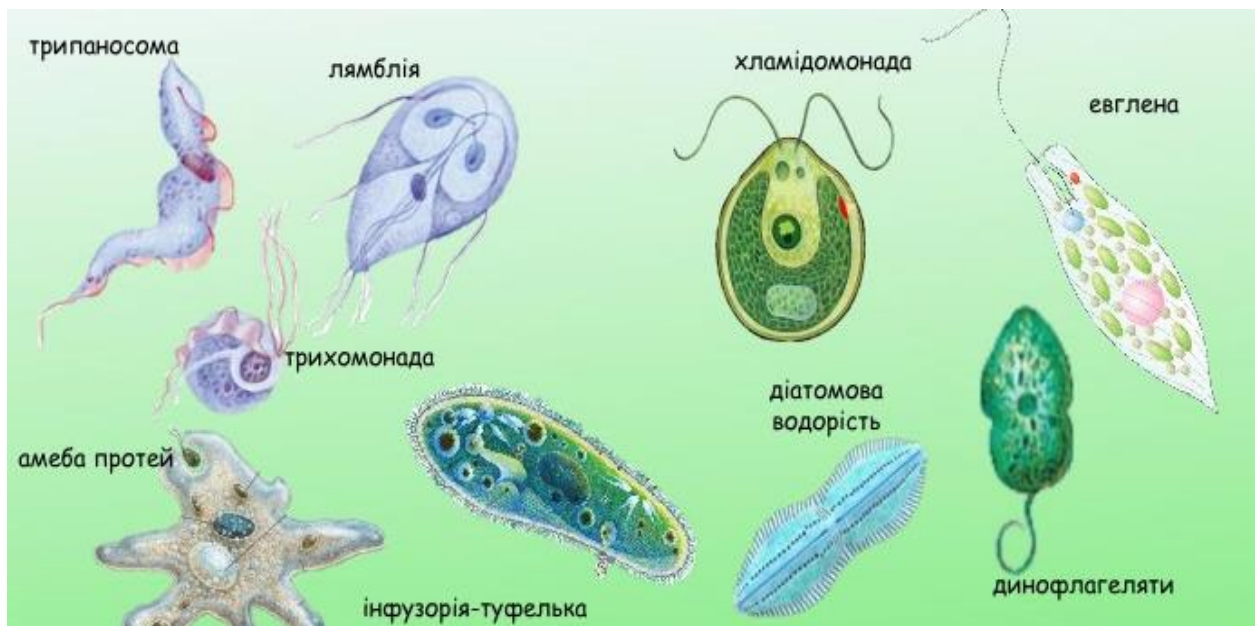


Рис. 5.1. Найпростіші – одноклітинні тварини

Черв'яки (Annelida). Серед багатоклітинних 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. Малоцетинкові 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 малоцетинкові 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 Цеце? 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 основні терміни, теорії, концепції, закони у галузі біології та споріднених наук і вміти їх застосовувати.

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, кисню 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).

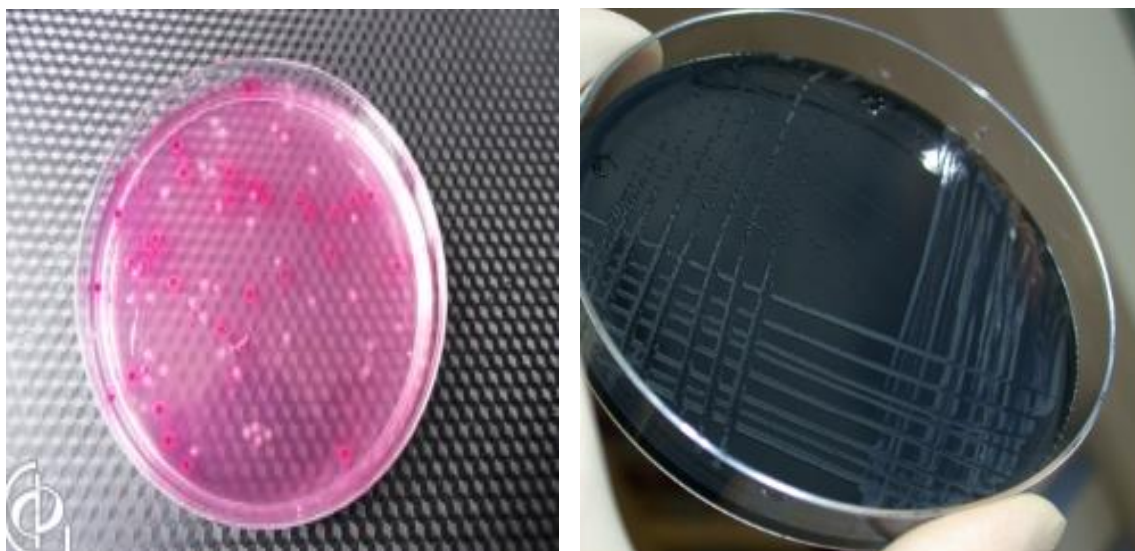


Рис. 6.1. Приклади поживних середовищ за призначенням:
А – середовище Ендо диференційно-діагностичне; Б – елективне середовище Вільсона-Блера

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		
Меяса	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 середовищ за консистенцією.
5. Наведіть приклади поживних середовищ 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 основні терміни, теорії, концепції, закони у галузі біології та споріднених наук і вміти їх застосовувати;
- ✓ Знати, розуміти та визначати основні параметри біотехнології і вміти їх застосовувати для вирішення природоохоронних задач; обґрунтовувати та використовувати біотехнології для захисту об'єктів довкілля, у ветеринарії, сільському господарстві, медицині тощо.

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 сенсibiliзації.

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 см² 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 виростили на 100 см² 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 виростило 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 накрійте кришками та помістіть у термостат при 29° 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 виростили 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.

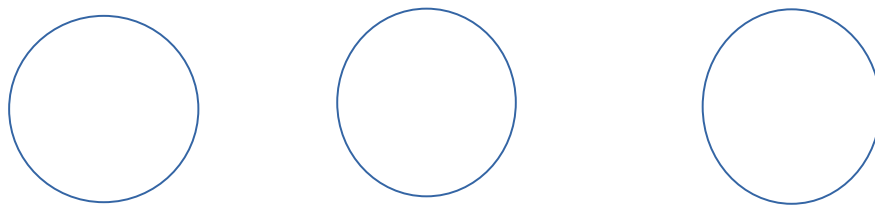


Рис. _____

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 см²;

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.

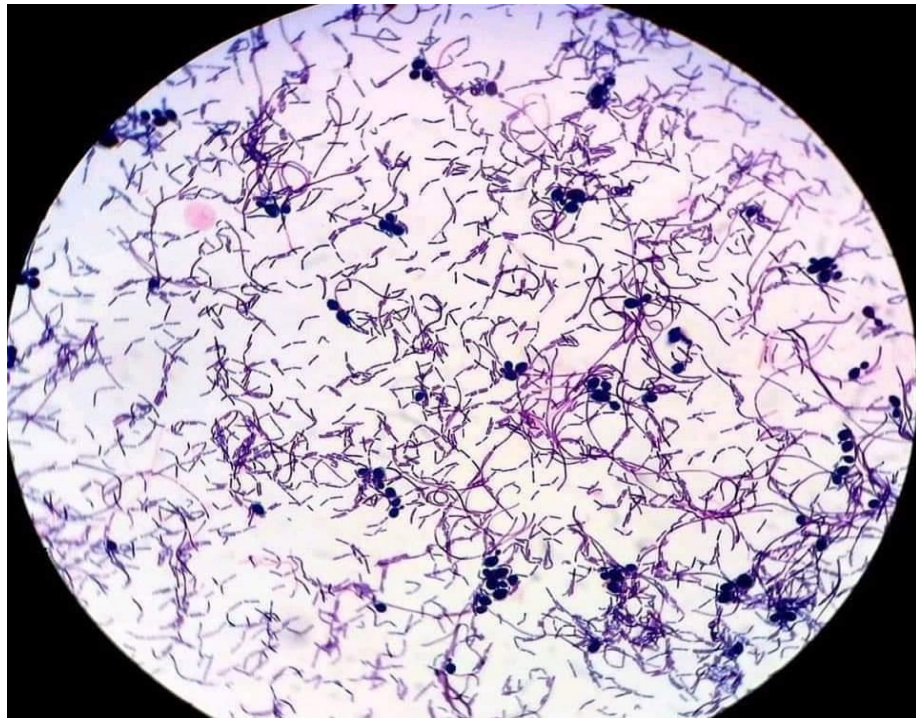


Рис. 7.1. Мікробіологічний препарат, зафарбований за Грамом

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

«МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ»

Мета роботи: освоїти методи одержання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: колби, дистильована вода, сіно, крейда, водяна баня, термостат, мікроскопи, предметні скельця, мікробіологічні петлі, барвники, спиртівка.

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, у ветеринарії, сільському господарстві, медицині тощо.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Культура мікроорганізмів – це розвинені на різних природних середовищах мікроорганізми, які отримані від тварини, людини, рослини, або іншого джерела.

Розвиток культури мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі призводить до утворення суспензії, осаду або біоплівки, ріст **колоній спостерігається** на твердому (агаризованому) середовищі. Культивування за умов визначеної температури (наприклад, у термостаті або качалочній кімнаті) називається **інкубацією**.

У біотехнологічній практиці широко використовуються **чисті культури** мікроорганізмів.

Чисті культури — це клітини одного виду. *Чиста культура мікроорганізмів* одного виду (рис. 8.1), що виділена з певного джерела і відрізняється від інших представників виду незначними ознаками, називається **штамом**. *Чиста культура мікроорганізмів*, що є потомством однієї єдиної клітини, називається **клоном**.



Рис. 8.1. Виділення чистої культури мікроорганізмів (засів штрихом на чашку Петрі)

Виділення **чистої культури** проводиться за такими етапами:

- одержання **накопичувальної культури**;
- виділення чистої культури з ізольованих колоній за методом Коха;
- визначення чистоти культури, що виділена, та вивчення її культуральних властивостей;
- ідентифікація мікроорганізмів шляхом вивчення різних властивостей: морфологічних, біохімічних (ферментативних), антигенних і т.п.

Накопичувальними культурами називаються культури, які складаються переважно з клітин одного виду.

Внесення клітин мікроорганізмів (зразки ґрунту, проби води, природні джерела тощо) у стерильне живильне середовище для одержання накопичувальної чи чистої культури називається **посівом, чи інокуляцією**. Для одержання **накопичувальних культур** кращим матеріалом для інокуляції служать субстрати, в яких відбувається їх природне «збагачення».

Елективні умови передбачають ряд факторів, наприклад, потреба мікроорганізмів у живильному субстраті, відношення до кисню, рівень рН середовища, температура, здатність до спороутворення та ін.

Підбираючи оптимальний склад живильного середовища та параметри культивування і додаючи природні субстратами, що містять різноманітні мікроорганізми, можна одержати **накопичувальну культуру** мікроорганізмів. Вона характеризується певними фізіолого-біохімічними властивостями і є матеріалом для виділення **чистої культури** (рис. 8.2).

Метод Коха (рис. 8.3) заснований на одержанні ізольованих колоній і виділенні з них **чистих культур** аеробних бактерій. Для цього з накопичувальної культури роблять посів на поверхню твердого (агаризованого) живильного середовища у чашки Петрі за такою послідовністю:

– розплавляють стерильне МПА у колбі на водяній бані і розливають його у 3-4 стерильні чашки Петрі;

– мікроорганізми висівають і розподіляють мікробіологічним шпателем або петлею, використовуючи техніку виснаженого штриха чи мазка (рис. 8.3) послідовно у декількох чашках Петрі з застиглим твердим агаризованим середовищем;

– на поверхню середовища першої чашки, використовуючи петлю, наносять краплю розведення накопичувальної культури та обережно розтирають її стерильним скляним шпателем по всій поверхні;

– цим же шпателем із клітинами мікроорганізмів, що залишилися на ньому, засівають поверхню другої чашки; далі цим же шпателем проводять вздовж поверхні третьої чашки Петрі;

– після засіву чашки необхідно перевернути догори дном і поставити у термостат із температурою, що сприятлива для даного мікроорганізму;

– інкубують посіви зазвичай протягом 2-5 діб (залежно від швидкості росту конкретних мікроорганізмів);

– після інкубації, коли у перших чашках спостерігається суцільний ріст мікроорганізмів («газон»), а в наступних утворюються ізольовані колонії, такі окремі колонії відбирають та відсівають петлею у пробірки на поверхню скошеного середовища або у рідке поживне середовище.

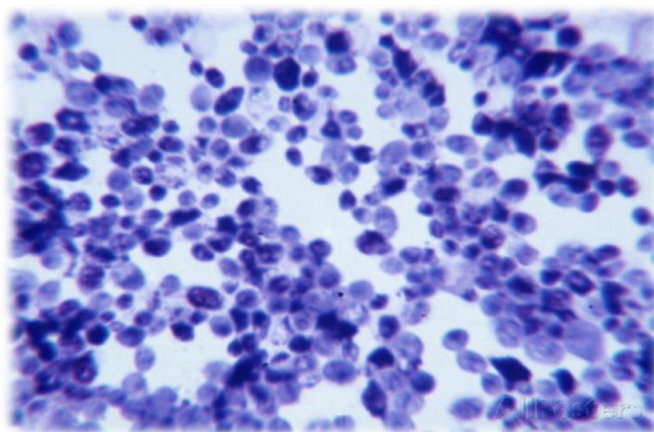


Рис. 8.2. Чиста культура *Saccharomyces cerevisiae*

У випадку засіву за секторами, у перших відбувається суцільний ріст, а уздовж наступних штрихів виростуть відособлені колонії мікроорганізмів, що представляють потомство однієї клітини – клон.

Усі операції з посіву мікроорганізмів виконуються стерильно біля вогню.

Висів із накопичувальної культури мікроорганізмів, що належать до факультативних аеробів чи факультативних анаеробів, для одержання ізольованих колоній роблять методом глибинного посіву в пробірки зі стовпчиком стерильного агару. Стерильною голкою беруть чисту культуру з колоній, одночасно виймають пробку, обпалюють край пробірки і, тримаючи її вверх дном, голкою над пальником роблять прокол до дна.

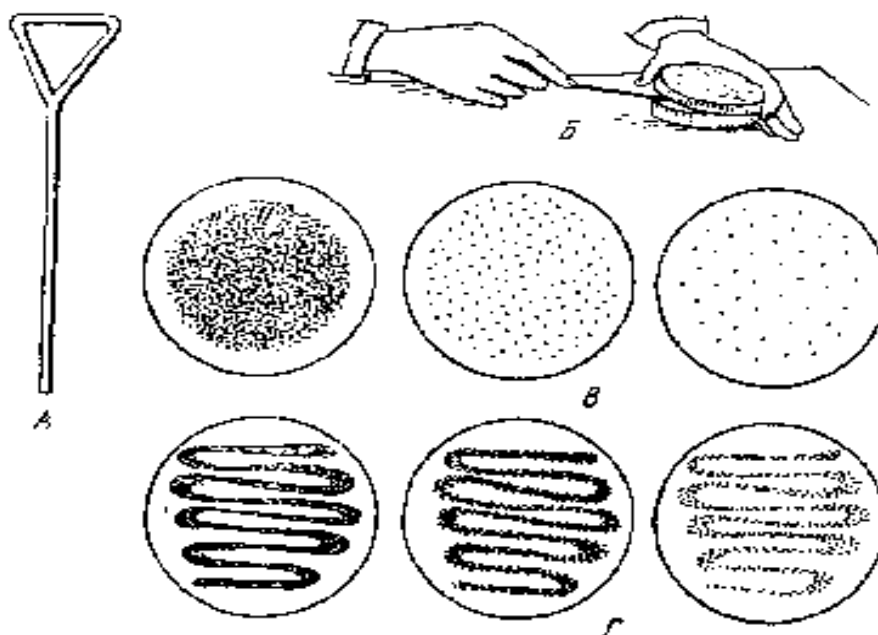


Рис. 8.3. Розсів мікроорганізмів на поверхню твердого середовища за методом Коха: а – мікробіологічний шпатель; б – засів; в – ріст мікроорганізмів після засіву шпателем; г – ріст мікроорганізмів після засіву петлею.

Виділення чистої культури *анаеробних* бактерій за методом Коха можливе тільки в умовах, що виключають доступ до них вільного кисню. *Анаеробні* мікроорганізми можна культивувати у звичайних пробірках і чашках Петрі, поміщаючи їх після посіву в анаеростати або скляні ексикатори.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Завдання 1. Дайте визначення мікробіологічним термінам: культура мікроорганізмів, колонія, інкубація (культивування), штам, клон, чиста культура, накопичувальна культура, посів.

Завдання 2. Опишіть методи одержання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів.

Завдання 3. Коротко опишіть способи промислового культивування мікроорганізмів.

Завдання 4. Отримайте накопичувальні культури аеробних спороутворюючих бактерій *Bacillus subtilis* (сінної палички):

а) для одержання накопичувальної культури *Bacillus subtilis* внесіть приблизно 1-3 г сіна у колбу на 250 мл і залийте 20-50 мл водопровідної води, що нагріта до 40-50°C.

б) додайте пучку крейди та прокип'ятіть отриману суміш протягом 15-30 хв (середовище буде мати колір міцного чаю – із сіна екстрагуються речовини, які слугують поживним субстратом для бактерій). За цей час, вегетативні клітини та спори більшості бактерій загинуть. Тільки спори деяких бактерій, у тому числі термостабільні спори *Bacillus subtilis*, залишаться життєздатними. Відвар розлийте у стерильні пробірки, закрийте їх ватними пробками та помістіть у термостат при 25-30°C.

в) через дві доби на поверхні середовища розвивається білувата плівка *Bacillus subtilis*, яка через 3-4 доби стає сірувато-зеленою. Інші мікроорганізми за цих умов проростають рідко та у невеликій кількості.

Завдання 5. Із отриманої накопичувальної культури *Bacillus subtilis* приготуйте фіксовані мікробіологічні препарати за допомогою методу простого забарвлення та розгляньте їх під мікроскопом.

Завдання 6. Сформууйте висновки та запишіть їх у зошит для лабораторних робіт.

Замалюйте побачене під мікроскопом та опишіть клітини накопичувальної культури, вкажіть що саме побачили під мікроскопом — палички або коки.

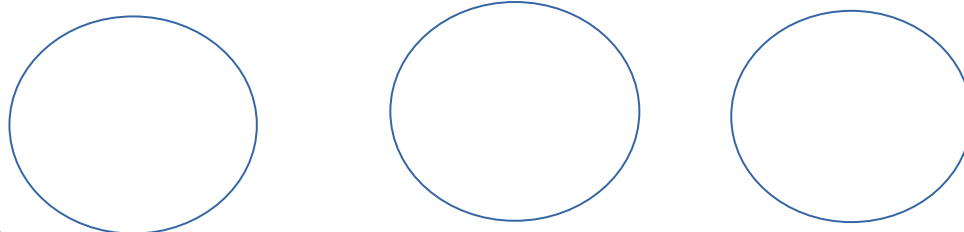


Рис. _____

Контрольні питання:

1. Яким чином можна виділити чисту культуру мікроорганізмів.
2. Які існують середовища для одержання накопичувальних культур мікроорганізмів? Опишіть особливості їх складу.
3. Охарактеризуйте метод Коха.
4. Назвіть основні відмінності між накопичувальною та чистою культурою.
5. З якою метою у біотехнології застосовують накопичувальні середовища.
6. Опишіть метод отримання накопичувальної культури сінної палички.

7. Наведіть характеристику *Bacillus subtilis* як об'єкта біотехнології.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

«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, розуміти та визначати основні параметри біотехнології і вміти їх застосовувати для вирішення природоохоронних задач; обґрунтовувати та використовувати біотехнології для захисту об'єктів довкілля, у ветеринарії, сільському господарстві, медицині тощо.

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, рН 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 м³;
- пілотні (дослідно-промислові) 10-100 м³;

– промислові 1000 м³ 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).

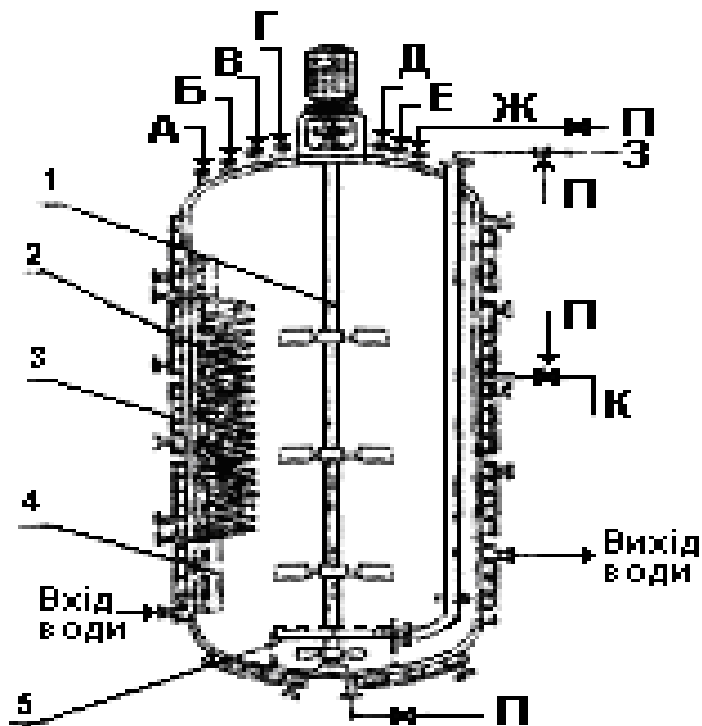


Рис. 9.3. Ферментатор періодичної дії:

- А – завантажувальна лінія;
- Б – видалення відпрацьованого повітря;
- В – подача стерильного стиснутого повітря;
- Г – подача пари;
- 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 сорочка;
- 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
<u>Лабораторні</u> : (навести приклади)		
<u>Промислові</u> : (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:

5 балів: 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.

4-3 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 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. – К.: 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 – К.: 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. – К.: «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	4
Лабораторна робота № 1. Правила техніки безпеки у біотехнологічній лабораторії. Лабораторний посуд та устаткування.....	5
Лабораторна робота № 2. Основні стадії біотехнологічного виробництва та різновиди біотехнологічних процесів.....	8
Лабораторна робота № 3. Віруси та бактеріофаги – біопродуценти біотехнологічних виробництв	18
Лабораторна робота № 4. Гриби, водорості та лишайники як біопродуценти біотехнологічних процесів.....	22
Лабораторна робота № 5. Найпростіші та вермикюльтура у біотехнологічному виробництві.....	28
Лабораторна робота № 6. Поживні середовища, що застосовують у біотехнології.....	31
Лабораторна робота № 7. Контроль якості повітря на підприємствах біотехнологічної промисловості.....	35
Лабораторна робота № 8. Методи одержання культур мікроорганізмів.....	40
Лабораторна робота № 9. Лабораторні та промислові біореактори	45
КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ.....	49
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	51

Навчальне видання

Сідашенко Ольга Ігорівна
Федотов Вячеслав Вікторович

ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт
для здобувачів ступеня бакалавра
освітньо-професійної програми «Технології захисту навколишнього
середовища»
зі спеціальності 183 Технології захисту навколишнього середовища

Видано в авторській редакції

Електронний ресурс.
Підписано до видання 10.12.2024. Авт. арк. 3,8.

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