

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

С.М. Лисицька, А.І. Горова

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації
до виконання практичних робіт з дисциплін «Біотехнологія», «Основи
промислової біотехнології студентами спеціальності
161 «Хімічні технології та інженерія»

Дніпро
НТУ «ДП»
2021

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



ФАКУЛЬТЕТ ПРИРОДНИЧИХ НАУК ТА ТЕХНОЛОГІЙ
Кафедра хімії

С.М. Лисицька, А.І. Горова

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації
до виконання практичних робіт з дисциплін «Біотехнологія», «Основи
промислової біотехнології» студентами спеціальності
161 «Хімічні технології та інженерія»

Дніпро
НТУ «ДП»
2021

Біотехнологія. Методичні рекомендації до виконання в дистанційному режимі контрольних і тестових завдань з дисциплін «Біотехнологія», «Основи промислової біотехнології» студентами спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» / С.М. Лисицька; М-во освіти і науки України, Нац. техн. ун-т «Дніпровська політехніка» – Дніпро : НТУ «ДП», 2021. – 43 с.

Автори: С.М. Лисицька, канд. с.-г. наук, доц.
А.І. Горова, д-р. біол. наук, проф.

Затверджено методичною комісією зі спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» (протокол № 2 від 22.02.2021) за поданням кафедри хімії (протокол № 10 від 17.02.2021).

Методичні рекомендації містять короткі теоретичні відомості про хіміко-біологічні особливості та екологічну спрямованість біотехнологічних процесів, можливість їх практичного використання за допомогою спеціальних методів досліджень при вирішенні проблем у виробництві господарчої продукції. Призначено для студентів напряму підготовки за спеціальністю 161 «Хімічні технології та інженерія». Подано завдання для самостійного закріплення матеріалу при роботі студентів у дистанційному режимі.

Відповідальна за випуск завідувач кафедри хімії, проф., д-р техн. наук,
О.Ю. Светкіна.

ПЕРЕДМОВА

Дані методичні рекомендації призначаються для підготовки бакалаврів спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» з дисциплін «Біотехнологія» і «Основи промислової біотехнології».

Вони містять стислий огляд теоретичного матеріалу, перелік відповідних практичних робіт, контрольних завдань, питання для самоконтролю, довідковий матеріал у вигляді схем, рисунків, таблиць, список рекомендованої літератури, глосарій основних термінів.

Метою методичних рекомендацій є закріплення теоретичних знань з лекційного курсу, а також набуття практичних навичок з даних дисциплін.

Проведення практичних робіт допоможе студентам у розумінні спрямованості біотехнологій в різних галузях народного господарства, а також доцільності використання біотехнологічних методів як інструментів виробництва екологічно безпечної продукції та в охороні довкілля.

1. ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ В БІОТЕХНОЛОГІЧНОМУ ПРАКТИКУМУ

1. Практичні роботи необхідно виконувати в спецодязі (халаті), захищаючи одяг та шкіру від попадання агресивних реактивів та обсіменіння мікроорганізмами.

2. Кожний студент повинен працювати на закріпленому за ним робочому місці.

3. Робоче місце слід підтримувати в чистоті, не захаращувати його посудом і побічними речами.

4. Забороняється виконувати практичні роботи без присутності викладача.

5. До виконання кожної роботи студенти можуть приступити тільки після отримання інструктажу з техніки безпеки та дозволу викладача.

6. Приступаючи до роботи, необхідно усвідомити методику роботи, правила її безпечного виконання.

7. Дослід необхідно проводити в точній відповідності з його описом у методичних рекомендаціях, особливо дотримуватися черги додавання реактивів.

8. Для виконання дослідів користуватися тільки чистим, сухим лабораторним посудом; для відмірювання кожного реактиву потрібно мати мірний посуд (піпетку, бюретку, мензурку, мірний циліндр або мірний стакан); не слід виливати надлишок налитого в пробірку реактиву назад у склянку, щоб не забруднити реактив.

9. Якщо у ході дослідів потрібне нагрівання реакційної суміші, то треба дотримуватися передбаченого способу нагрівання: на водяній бані, на електроплитці та ін. Сильно леткі пальні речовини небезпечно нагрівати на відкритому вогні.

10. Пролиті на підлогу та стіл хімічні речовини знешкоджувати і прибирати під керівництвом лаборанта (викладача) відповідно до правил.

11. Виконувати роботу необхідно акуратно, сумлінно, уважно, ощадливо, бути спостережливим.

12. Після закінчення роботи слід привести в порядок своє робоче місце: помити посуд, протерти поверхню стола, закрити водопровідні крани, виключити електричні прилади.

1.1. Правила техніки безпеки при роботі з біоб'єктами

1. У лабораторії забороняється приймати їжу, пити воду.

2. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки інструментами.

3. При випадковому попаданні біологічного матеріалу (особливо мікроорганізмів) на стіл, руки, потрібно провести обробку дезинфекційним розчином (наприклад, хлораміном).

4. Після роботи необхідно ретельно вимити руки з використанням дезинфекційних засобів (детергентів).

1.2. 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 – застосовується в будь-якій хімічній лабораторії для різноманітних цілей;
- посуд спеціального призначення – використовується з будь-якою однією метою;
- мірний посуд, призначений для відмірювання точних об'ємів рідин, розчинів та газів.

До *посуду загального призначення* відносяться: пробірки, хімічні лійки, хімічні стакани, плоскодонні (круглі) колби, конічні колби (Ерленмейєра), крапельниці, скляні холодильники.

Посуд спеціального призначення застосовується в особливих дослідних роботах, органічних та неорганічних синтезах. До нього відносяться, наприклад, чашка Петрі, качалочна колба, фарфорова ступка з товкачиком та ін.

Мірний посуд застосовується для відмірювання об'ємів рідин: мірні циліндри, піпетки, бюретки, мірні колби та стакани.

2. ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПРОЦЕСІВ

Біотехнологічними продуктами є речовини, що утворюються в результаті життєдіяльності живих клітин, тканин біооб'єктів у штучних умовах. Найбільш поширена *біотехнологічна продукція* являє собою біологічно активні речовини (вітаміни, ферменти, гормони, амінокислоти, білки, вуглеводи, нуклеотиди, антибіотики, стероїди, імуноглобуліни, алкалоїди, пестициди та ін.), продукти бродіння (спирти, органічні кислоти, ацетон), енергетичні речовини (біогаз, етанол, водень), рідкі метали (біометалургія), речовини харчового (фруктозо-глюкозний сироп) та кормового призначення, продукти на основі технології культури клітин – вакцини, компоненти крові, моноклональні антитіла.

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.

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, нуклеотидов, вітамінів), які перевищують потреби мікробної клітини.

Реалізація біотехнологічного процесу здійснюється за наступною принциповою схемою (рис. 1).

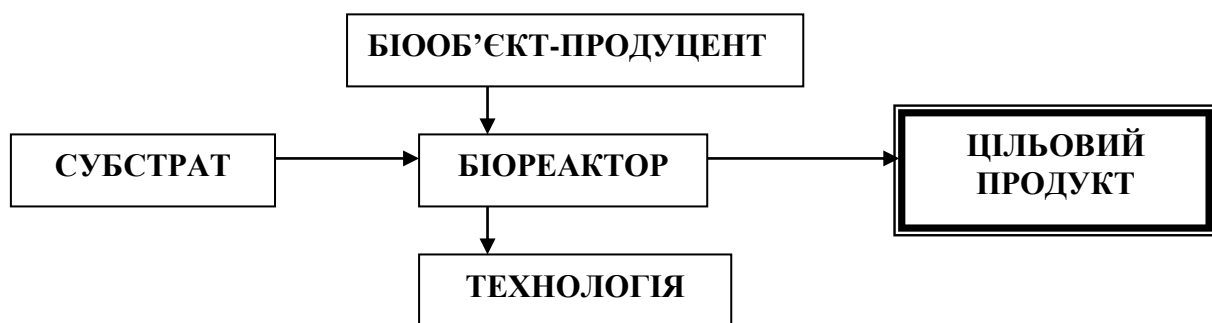


Рис. 1. Блок-схема біотехнологічного процесу

Існуючі біотехнологічні виробництва можуть відрізнятися своїми біооб'єктами-продуцентами, сировиною, кількістю виробничих стадій та технологічними режимами. Однак їх можна представити однією узагальненою типовою схемою (рис.2).

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

Основною стадією є власно *біотехнологічна стадія*, на якій з використанням того або іншого біологічного об'єкту-продуценту

(мікроорганізмів, ізольованих клітин, тканин, ферментів чи клітинних органел), виникає утворення цільового продукту за такими технологічними процесами:

– *ферментація* – процес, який здійснюється шляхом культивування мікроорганізмів (виробництво кефіру, йогурту шляхом молочнокислого бродіння; виробництво спирту, пива – спиртовим бродінням; виробництво амінокислоти лізину, лимонної кислоти з м'яса – 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 метаногенних 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 вилуження* – процес переведення сполук металів, що не розчиняються у воді, за допомогою мікроорганізмів у розчинний вигляд (виділення металів із піритних руд).



Рис. 2. Типова узагальнена схема основних стадій біотехнологічного виробництва

Екологічні галузі застосування біотехнологічної продукції базуються на екологічній безпечності та на біосинтетичних можливостях біооб'єктів-продуцентів:

– вірусів, в медицині: розробка вакцин, біопрепаратів для створення в організмі штучного імунітету, використання рекомбінантних вакцин; в *фармацевтичній промисловості*: розробка діагностикумів, вакцин, векторів на основі ДНК-вмісних вірусів рослин;

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

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

– водоростей: отримання харчових добавок, кормового білка, енергії (фотоліз води), очищення стічної води в аеротенках, очищення води за допомогою біофільтрів;

– використання найпростіших: як складова частина активного мулу при очищення водоймищ та стічних вод, в якості тест-індикаторів;

– використання черв'яків: для одержання біогумусу (як добрива), біогумату (фітогормонів).

– одержання трансгенних рослин: 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);

– використання клітинних культур 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).

– клонування та експресія генів в різних організмах.

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.

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 *селекції* (спрямований відбір мутантів, тобто організмів зі зміненою спадковою інформацією – штучний відбір особин з необхідними ознаками; індукований мутагенез, відбір клонів); методи *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); методи *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 живильних речовин (органічних, неорганічних), що йому необхідні, і використовуються для життєдіяльності (росту і розмноження, тобто конструктивних та енергетичних процесів).

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

При культивуванні біооб'єктів в 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 проходив процес культивування біомаси (культуральна рідина).

Методами відділення біомаси від культуральної рідини є сепарування та центрифугування; фільтрація; осадження за допомогою флокулянтів; дистиляція; сублимація; зневоднення (випаровування, сушіння); ліофілізація; заморожування; осадження шляхом змін розчинності речовини; кристалізація; сорбція; екстракція; ультрафільтрація на мембранних фільтрах.

Важливим та відповідальним етапом заключної стадії є модифікація (змінення) продукту для його подальшого використання людиною, а також зберігання продукту. Модифікація – необхідний етап в отриманні ряду ферментів, гормонів, препаратів медичного призначення. Мова йде про перебудову сполук тваринного, рослинного або мікробного походження з метою надання їм специфічних властивостей, необхідних людині. Наприклад, у бичачого інсуліну “відстригають” амінокислотні залишки, після чого він становиться ідентичним людському гормону.

Збереження клітин мікроорганізмів без втрати цінних якісних властивостей є можливим, якщо гальмувати їх життєво важливі процеси, в тому числі, і генетичні зміни (клітини у стані, який схожий на анабіоз).

Методи збереження (консервації) біопродукції: ліофілізація (зневоднення під вакуумом після заморожування); повітряне сушіння; збереження у вигляді спор; кріоконсервація (глибоке заморожування у рідкому азоті при -196°C), що запобігає змінам генофонду; комбіновані методи (часткове сушіння з подальшою ліофілізацією).

Контрольні питання для самоперевірки:

1. Сучасне визначення “біотехнології”.
2. Історичні передумови виникнення біотехнології.
3. Примітивна біотехнологія.
4. Основні продукти біотехнології.
5. Галузі використання біотехнології.
6. Головні періоди у розвитку знань про механізми життєдіяльності, які використовуються у біотехнологічних процесах.
7. Допастерівський період розвитку біотехнології.
8. Пастерівський період розвитку біотехнології.
9. Відкриття, що зроблені Пастером.
10. Етап організації промислового виробництва антибіотиків.
11. Післявоєнний етап розвитку біотехнології.
12. Сучасний етап розвитку біотехнологій в екології.
13. Розвиток екологічних біотехнологій в Україні.
14. Проблеми екологічної біотехнології.

Практична робота № 1

Тема: Об'єкти-продуценти біотехнології, їх класифікація: віруси, фаги, бактерії, найпростіші, водорості, гриби, вищі рослини

Мета роботи: ознайомитися з різними видами мікроорганізмів, які беруть участь у біотехнологічних процесах.

Матеріали та обладнання: мікроскоп МІКМЕД-1, препарувальна голка, предметні і покривні скельця, пінцет, піпетка, скальпель, таблиці, рисунки, фотокартки; суспензія добової культури дріжджів *Saccharomyces cereviceae*, цвілеві гриби (*Mucor*; *Penicillium*; *Aspergillus*), наочні препарати сухих та законсервованих шапкових грибів (*Pleurotus ostreatus*), водорості у пробах річної води (*Micrococcus*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Chara*), живі лишайники; застійна вода (мул) з представниками найпростіших (*Protozoa*).

Першою стадією біотехнологічного процесу є підбір *біоб'єктів-продуцентів*, які знаходяться на різних рівнях організації живої матерії. Це об'єкти організменного рівня: віруси, фаги, бактерії, гриби (мікро- і макроміцети), водорості, протозойні організми (найпростіші), черв'яки, рослини, тварини, людина або надорганізменного: їх тканини, клітини, структурні компоненти клітин (біомолекули, органели, продукти метаболізму) (див. рис. 2).

Мікроорганізми, як *об'єкти-продуценти* в біотехнології, мають перевагу завдяки ряду властивостей:

- малі розміри (морфологічні особливості);
- активність (висока швидкість росту на живильних середовищах);
- простота геному;
- “гнучкість” обміну речовин;
- значна адаптаційна здатність до умов зовнішнього середовища.

Основними вимогами до мікроорганізмів в біотехнології є висока швидкість росту, стійкість до зараження сторонньою мікрофлорою, культивування на дешевих, доступних, нехарчових субстратах.

Перші описи мікроорганізмів, які з'явилися наприкінці XVII століття, зробив голандський вчений Антоніо Ван Левенгук за допомогою мікроскопу.

Світ мікроорганізмів включає значну різноманітність форм, яким властиві малі розміри – від десятих долей до десятків, сотен мкм (мікрометрів).

Мікроорганізми відносяться до 3-х надцарств: без'ядерні (акаріоти), доядерні (прокаріоти), ядерні (еукаріоти); 6-ти Царств: віруси, бактерії, архебактерії, рослини, тварини, гриби (рис. 2).

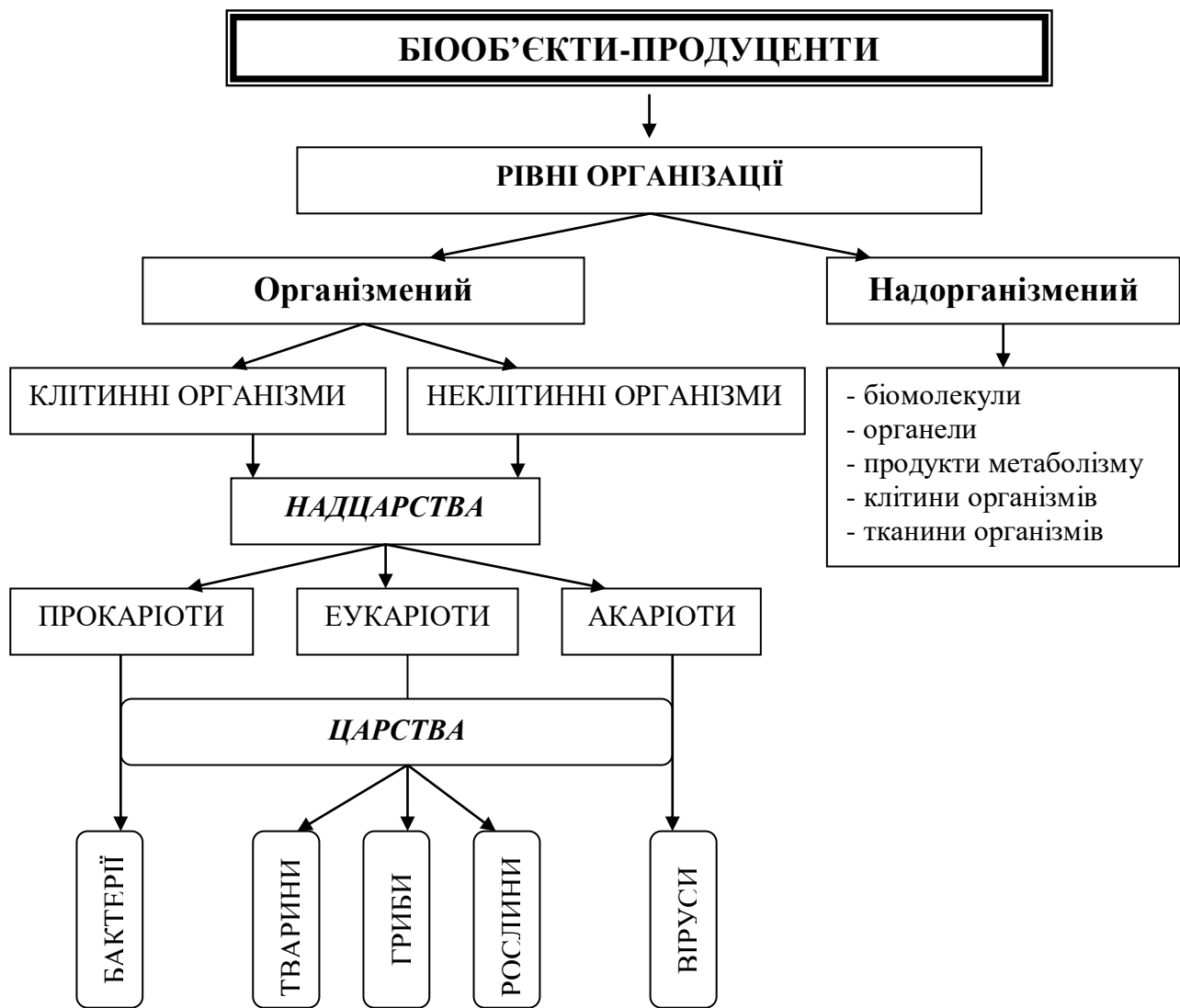


Рис. 2. Характеристика біоб'єктів-продуцентів за рівнями організації.

До акаріотичних організмів (неклітинні форми життя) – наноорганізмів відносяться *віруси*, *бактеріофаги*. Основою їх структурної будови є нуклеїнові кислоти (ДНК або РНК) та білки, які не пов'язані між собою ковалентними зв'язками.

Віруси – мікроорганізми, 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 облигатними 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 (рис 3). 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. Саме після проникнення вірусів

у клітини живого організму завдяки мобілізації метаболічних систем клітини-хазяїна утворюється велика кількість копій вірусних геномів, які пригнічують біосинтез клітин та примушують їх утворювати власні білки і нуклеїнові кислоти.

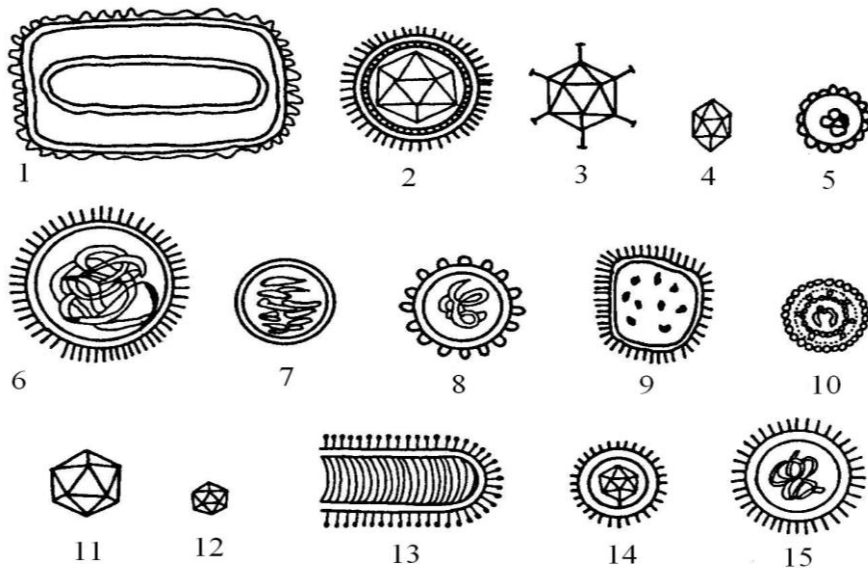


Рис. 3. Різні форми вірусів (за Воробйовим А.А., Кривошеїним Ю.С., 2001):

- 1 – вірус оспи; 2 – вірус герпесу; 3 – аденовірус; 4 – паповавірус;
 5 – гепаднавірус; 6 – параміксовірус; 7 – вірус грипу; 8 – коронавірус;
 9 – аренавірус; 10 – ретровірус; 11 – реовірус; 12 – пікорнавірус;
 13 – вірус бешихи; 14 – тогавірус, флавівірус; 15 – бун'явірус.

Бактеріофаги – облігатні паразити мікроорганізмів (віруси бактерій). Звичайно бактеріофаги мають багатогранну призматичну голівку та відросток (розміри 60-200 нм). Вони відносяться до дезоксивірусів: усередині голівки є одна чи дві нитки ДНК. Через відросток ДНК із голівки бактеріофагу переходить у клітину мікроорганізму. Морфологічні особливості елементів сформованих вірусних часток віріонів та бактеріофагу T2 зображені на рис. 3.

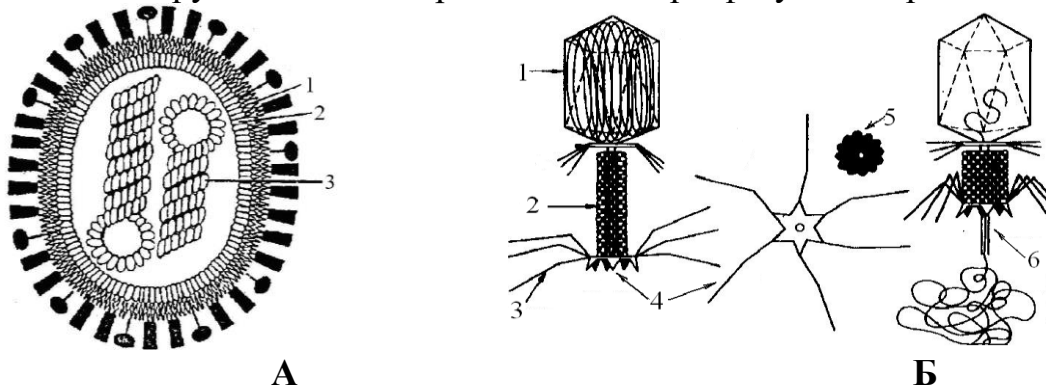


Рис. 4. Структура віріону (А) та бактеріофагу (Б)
 (за Єліновим Н.П., 1995):

- А:** 1 – біліпідний шар; 2 – білковий шар; 3 – рибонуклеопротеїн;
Б: 1 – голівка з ДНК; 2 – чохол; 3 – хвостові нитки; 4 – базальна пластинка; 5 – поперечний розріз чохла;
 6 – фаг з чохлам, що скоротився після адсорбції та ін'єкції.

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

Бактерії (Eubacteria) – перші живі мікроскопічні організми (діаметр їх складає 0,2-10,0 мкм), що виникли приблизно 3,5 мільярди років тому. Вони мають різну форму: кулясту (коки), паличкоподібну (бактерії, бацили), звиту (вібріони, спірили, спірохети) (рис. 5).

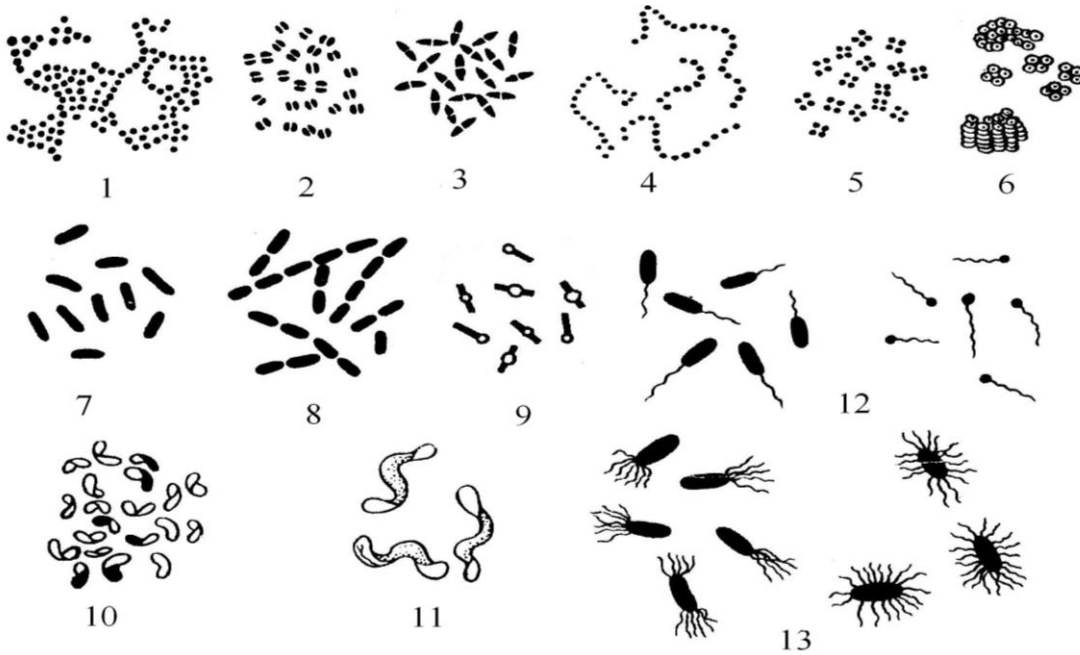


Рис. 5. Різноманітна форма бактерій:

- 1 – коки; 2, 3 – диплококи; 4 – стрептококи; 5 – тетракоки; 6 – сарцини;
7 – палички; 8 – ланцюги паличок; 9 – бацили; 10 – вібріони;
11 – спірили; 12 – джгутикові форми; 13 – війкові форми.

Окрім ядерного еквіваленту нуклеоїду, бактерії мають додатковий периферійний ДНК-вмісний елемент – *плазмиду* – маленьку кільцеву структуру з декількох генів, які здатні кодувати певні ферменти клітини. Плазміда використовується у біотехнології як вектор (транспортний засіб) для перенесення генів у методах генетичної інженерії. Основними речовинами клітинної стінки бактерій є гігантська молекула пептидоглікану (муреїн, мукопептид) і тейхоєві кислоти.

Бактерії є гетеротрофами, тобто живляться готовими органічними речовинами, які розкладають на більш прості і при цьому одержують енергію для свого існування. Деякі з них використовують енергію, що утворюється в результаті окислення мінеральних речовин. Лише невелика група бактерій (зелені та пурпурні сіркобактерії) має бактеріохлорофіл і здатна синтезувати органічні речовини, поглинаючи сонячну енергію.

Багато бактерій з несприятливих умов здатні в своїх клітинах утворювати спори. Такі бактерії називаються бацилами. В одній клітині формується одна товстостінна спора. Спороутворення у бактерій не є нестатевим розмноженням, а лише тимчасова форма існування. Спори можуть тривалий час зберігати

життєздатність. Потрапивши в сприятливі умови: достатньої вологості, температури та інших факторів, спора проростає. При цьому її щільна оболонка руйнується. Вона покривається новою клітинною стінкою і бактеріальна клітина переходить до нестатевого розмноження. Типового статевого процесу у бактерій немає.

Одні групи бактерій – *аероби* – вимагають для свого існування наявності кисню, інші – *анаероби* – розвиваються без кисню, він для них шкідливий. Є проміжні в цьому відношенні форми бактерій – факультативні аероби, які можуть розвиватися як при наявності, так і у відсутності кисню.

Бактерії обумовлюють процеси азотфіксації, амоніфікації, нітрифікації, денітрифікації, бродіння, гниття, тощо. Більшість бактерій є корисними організмами, але чимало і патогенних. Патогенні бактерії викликають захворювання людини, тварин, рослин. Для людини це дуже небезпечні хвороби: туберкульоз, холера, пневмонія, гонорея, дифтерія, сифіліс та ін. До корисних бактерій відносяться азотфіксуючі, молочнокислі, оцтовокислі, пропіонові, метаноутворюючі, кишкова та сенна палички та багато інших. Всі вони дуже широко використовуються у біотехнологічних процесах.

Бактерії, що живляться за рахунок мертвої органічної речовини, називаються сапрофітами, ті, що за рахунок живих організмів – паразитами.

Згідно класифікації Берджі, бактерії розподіляють на чотири відділи: грацилікути (*Gracilicutes*) – бактерії з тонкою клітинною стінкою, грамнегативні; фірмікути (*Firmicutes*) – бактерії з товстою клітинною стінкою, грампозитивні; тенерікути (*Tenericutes*) – бактерії “м’яккі”, “ніжні” без ригідної клітинної стінки, включаючи мікоплазми; мендозікути (*Mendosicutes*), так звані *архебактерії*, які відрізняються дефектною клітинною стінкою, особливостями будови рибосом, мембран та рибосомних РНК (рРНК).

Архебактерії були відкриті недавно (у 70-ті роки) і відрізняються від інших видів бактерій за своїми ознаками. До них відносять групи бактерій, стійких до екстремальних умов – ряд термофільних, метаноутворюючих та галофільних (солелюбів).

Малі розміри бактерій не дозволяють їм накопичувати продукти метаболізму, ферменти у резервний запас, тому вони виділяють їх зовні за певними умовами. Мікробний синтез бактерій дозволяє отримувати ферменти, гормони, кормовий білок на різних субстратах, біогаз, одержувати вітаміни (С, В₂, В₁₂, провітамін А – β-каротин), антибіотики та інші дуже корисні для людини речовини.

Ціанобактерії або *синьо-зелені водорості* (*Cyanea*) – автотрофні прокаріоти, займають проміжне положення між бактеріями і рослинами. Їх основним пігментом є хлорофіл *a*; крім того, присутні також каротиноїди і фікобіліни (фікоціанін, фікоерітрин та аллофікоціанін). У системі фототрофних мікроорганізмів мають особливе значення, тому що здатні до фотосинтезу із виділенням кисню, на відміну від бактерій. Найчастіше утворюють різні колонії із одноклітинних форм або нитчастих. Клітинна оболонка синьо-зелених водоростей відповідає за складом оболонці грам-негативних бактерій (одношарова). При надлишку органічних речовин здатні переходити на

міксотрофне (змішане) живлення. Багато видів можуть вступати у симбіоз з грибами, утворюючи лишайники. Деякі можуть вступати в симбіоз з папороттю (наприклад, *Anabaena spp.*). У біотехнологічних процесах ціанобактерії використовують як біодобрива (“зелені добрива”), як джерело білка (спіруліна), підсилювач смаку (носток) та ін. (рис. 6).

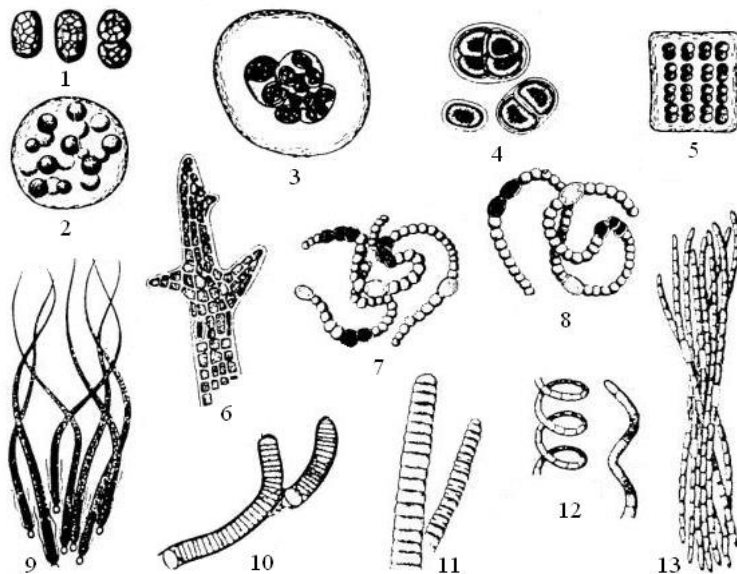


Рис. 6. Синьо-зелені водорості:

- 1 – *Synechococcus*;
- 2 – *Micrococcus*;
- 3 – *Gleocapsa*;
- 4 – *Chroococcus*;
- 5 – *Merismopedia*;
- 6 – *Stigonema*; 7 – *Nostoc*;
- 8 – *Anabena*; 9 – *Ribularia*;
- 10 – *Tolypothrix*;
- 11 – *Oscillatoria*;
- 12 – *Spirulina*;
- 13 – *Aphanizomenon*.

Гриби (Fungi) – це велика група еукаріотичних, гетеротрофних, безхлорофільних організмів. Vegetативне 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 міцелій – багатоклітинний, а у нижчих – неклітинний, багатоядерний. У клітинному міцелії чітко проглядаються перегородки (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. Vegetативне розмноження відбувається частинами міцелію. Нестатеве – за допомогою спеціальних спор або конідій.

Гриби мають схожість з рослинними та тваринними організмами. З тваринами гриби поєднує наявність хітину у клітинній стінці, запасний вуглевод глікоген, відсутність пластид, гетеротрофне живлення, потреба у вітамінах. Риси схожості з рослинами є здатність до не обмеженого росту, живлення шляхом всмоктування речовин, нерухомість, розмноження спорами, присутність вакуолей.

До мікроскопічних грибів – мікроміцетів – відносяться дріжджі, цвілеві гриби (мукор, пеніцил, аспергил, дріжджі та ін.) (рис. 7, А-Г).

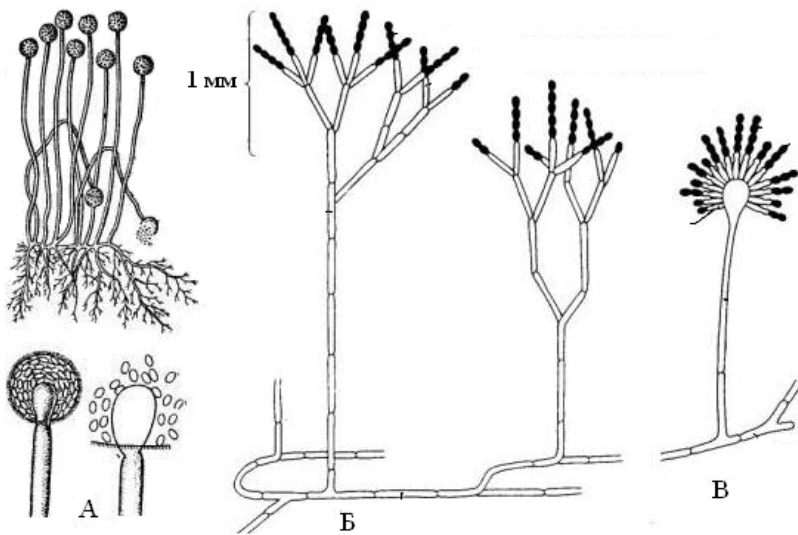


Рис. 7. Мікроміцети та макроміцети:

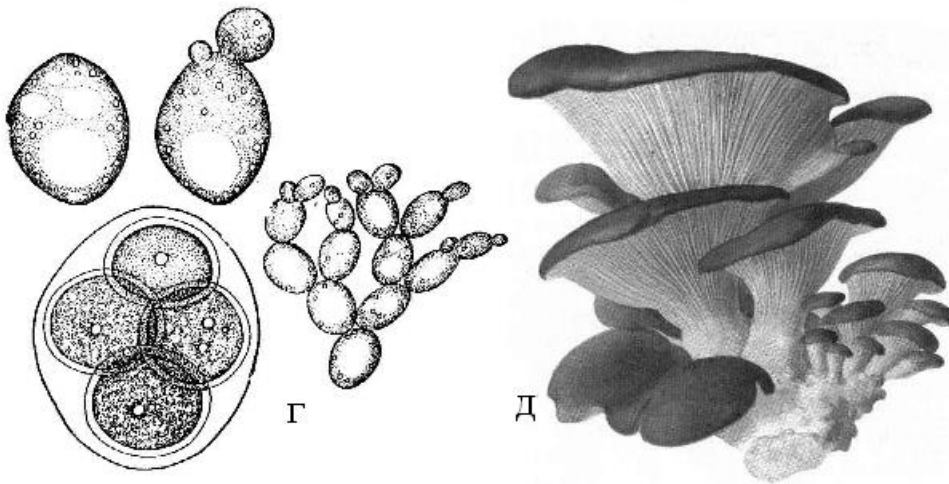
А – міцелій та спорангієносці зі спорами гриба *Mucor*;

Б – мікроскопічна китиця конідієносця *Penicillium*;

В – мікрофотографія *Aspergillus niger*;

Г – клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* окремі та ті, що брунькуються;

Д – Глива звичайна *Pleurotus ostreatus*.



Використання мікроскопічних грибів дозволяє одержувати амілолітичні, ліполітичні ферменти, вітаміни (β -каротин, вітаміни групи В), харчовий білок, антибіотики. Вони є активними продуцентами ферментів для виготовлення сирів, кисломолочної продукції. В отриманні етанолу, пива, вина, харчового та кормового білка широко застосовуються дріжджі.

Макроскопічні гриби (рис. 7, Д) – макроміцети (базидіоміцети: глива, печериця, білий гриб, лисички та ін.) – є продуцентами харчового білка. В останні роки була з'ясована бактерицидна, протипухлинна і, навіть, антиснідова активність вищих базидіоміцетів.

Гриби здатні виділяти у навколишнє середовище ферменти і шляхом абсорбції поглинати живильні речовини, продукти ферментативного гідролізу природних біополімерів та інших розчинних сполук. Такий спосіб живлення дозволяє віднести ґрунтових представників Царства Fungi у найбільшу екологічну групу, яка бере участь в мінералізації органічних речовин в екосистемах, тобто колообігу речовин.

Водорості (Algae) – це нижчі таломні рослини, первинним середовищем існування яких є вода. Вони включають десять самотійних відділів: зелені,

жовто-зелені, золотисті, діатомові, бурі, червоні, пиррофітові, евгленові, харові, синьо-зелені. Синьо-зелені або ціанобактерії – водорості Надцарства Procariotae, інші відділи водоростей відносяться до Надцарства Eucariotae. До їх складу входять пігментами хлорофіл *a* і *b*, каротиноїди; резервним вуглеводом є крохмаль. Деякі види (рис. 8, А-Д) мають джгутики для переміщення. Нестатеве розмноження відбувається зооспорами, вегетативно, поділом навпіл або брунькуванням. Статевий процес відбувається у формі гологамії та мерогамії.

За типами водорості підрозділяються на активно рухомі одноклітинні та колоніальні, нерухомі одноклітинні та багатоклітинні, нитчасті, пластинчасті і сифонові (мають багатоядерний талом) (рис. 8, А-Д).

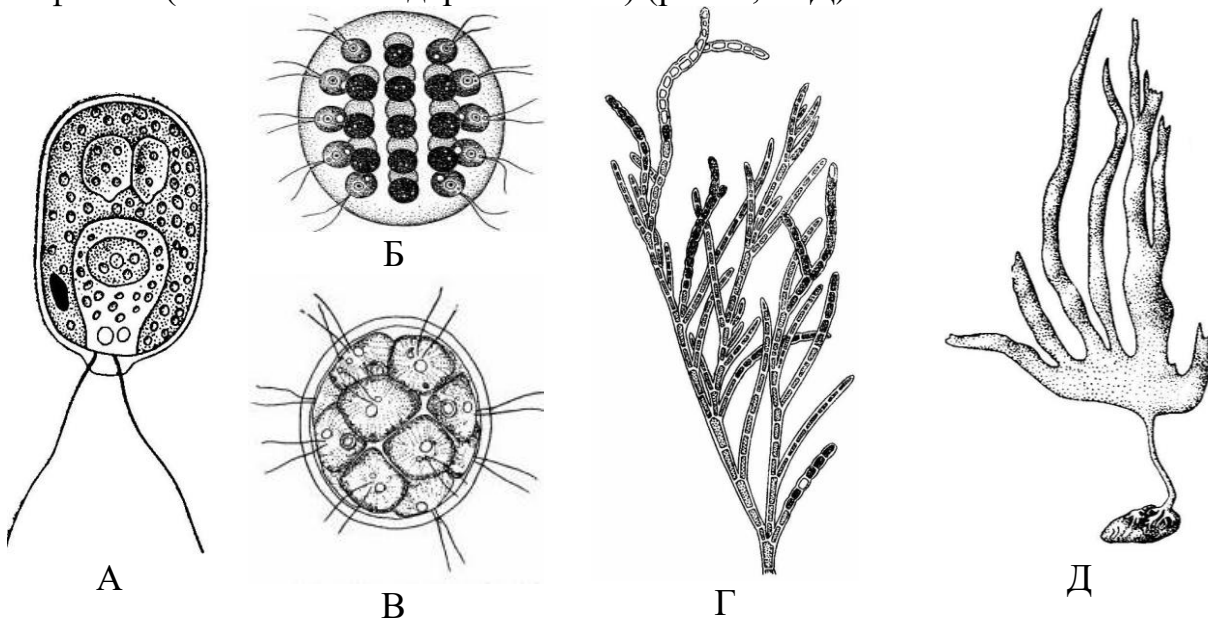


Рис. 8. Типи водоростей:

А – вегетативна особина *Chlamydomonas*; Б – ценобій *Eudorina elegans*;
 В – ценобій *Pandorina*; Г – *Cladophora*; Д – *Laminaria saccharina*

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 - складний полісахарид, здатний до гелеутворення, який застосовують для ущільнення живильних середовищ у мікробіології. За допомогою водоростей можливе отримання біомаси та біологічно активних речовин у системах життєзабезпечення космічних кораблів, енергії (фотоліз води), очищення стічної води в аеротенках, очищення води за допомогою біофільтрів тощо.

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

Вегетативне тіло лишайників – це талом (слань). Гіфи гриба сплітаються з водоростю, 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. 9, А), що практично невіддільна від нього; накипні лишайники складають біля 80% всіх лишайників;

– листкові – тіло у вигляді листовидних пластинок, які прикріплені до субстрату пучками гіф (ніжка) та легко відділяються від нього (рис. 9, В);

– кущові – талом у вигляді більш або менш розгалужених кущів довжиною до 15 см (можуть досягати і 7-8 м – тайговий лишайник уснея), які підіймаються від субстрату (грунту) або звисають з гілок. У кущових лишайників талом є циліндричним із “серцевиною” у центрі (рис. 9, Б).

Розмноження лишайників переважно вегетативне: фрагментами талому. Ростуть вони дуже повільно – за рік у різних видів слань зростає від 1 до 10 мм.

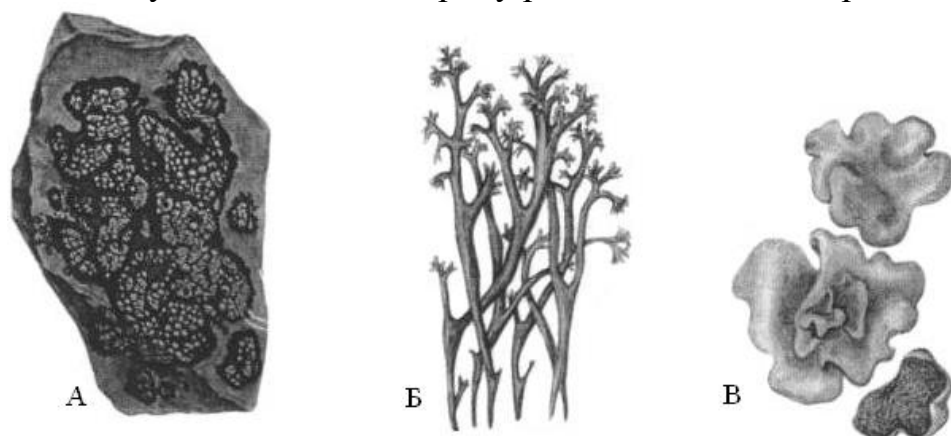


Рис. 9. Морфологічні групи лишайників:

А – накипний Ryozocarpon; Б – кущовий Spherophorus;

В – група таломів листкового Dermatocarpon

У біотехнології лишайники можливо застосовувати для отримання натуральних барвників, закріплювачів запахів у парфумах, як продукт харчування, як джерело ліхенових кислот, що володіють бактерицидною активністю. Із тайгового лишайника уснеї отримують антисептичну речовину – уснінову кислоту.

Найпростіші (Protozoa) – мікроскопічні одноклітинні тварини Надцарства Eucariotae, які мешкають у воді, ґрунті або паразитують у тілі тварин. Підцарство включає п’ять типів: Саркодові, Джгутикові, Споровики, Інфузорії, Кнідоспоридії. Класифікація найпростіших заснована на способах переміщення: за допомогою псевдоподій (псевдоніжки) – амьоба, форамініфери, радіолярії; джгутиків – евглена зелена, лямблії, трипаносома; чи війок – інфузорія-туфелька, сувоїки або нерухомі форми – малярійний плазмодій. Тіло найпростіших складається з цитоплазми, одного або декількох ядер і органодів, які виконують певні життєві функції. За несприятливих умов найпростіші виділяють захисну оболонку і утворюють цисту. Більшість найпростіших живе у водному середовищі (рис. 10, А-Г).

Найпростіші входять до складу ґрунтових біоценозів, активних мулів (зооглея), які використовуються у процесах біологічного очищення водоймищ, стічних вод. В активному мулі найпростіші виконують функції підтримання чисельного складу мікроорганізмів. Живлячись бактеріями та плаваючими речовинами, вони сприяють також освітленню води. Protozoa здатні виконувати функцію тест-індикаторів якості очищення стоків.

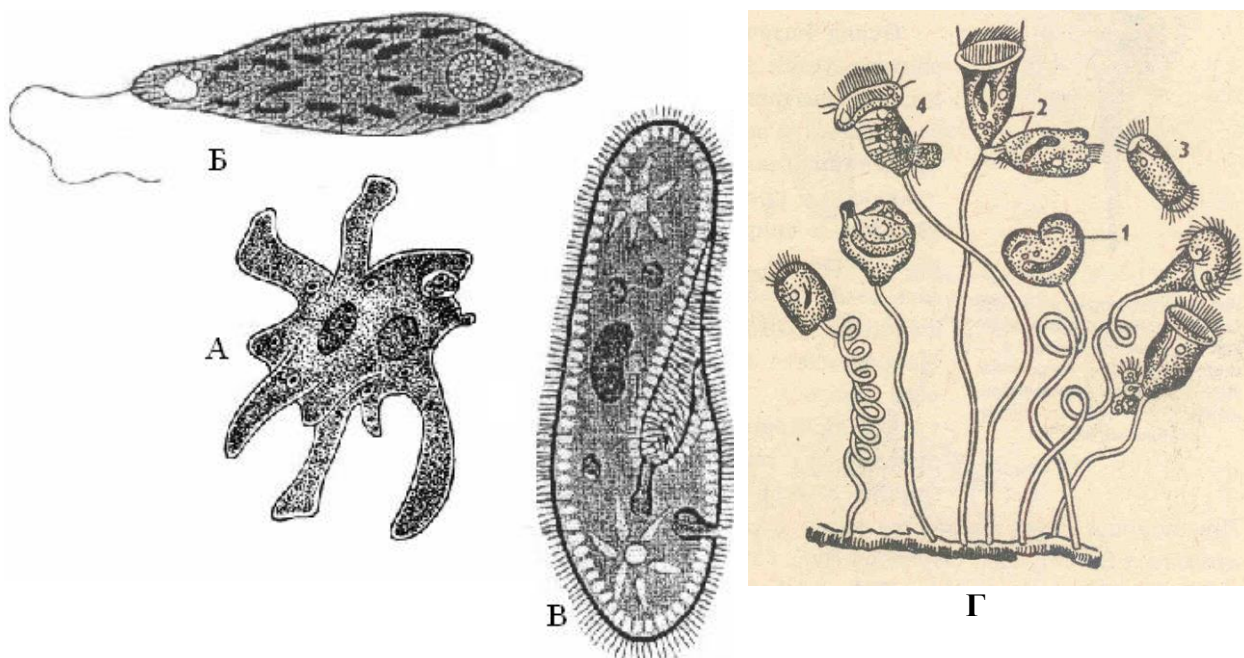


Рис. 10. Найпростіші:

А – Амеба; Б – Зелена евглена; В – Інфузорія туфелька;
Г – Коловійкові інфузорії – сувоїки Vorticella

Черв'яки (Annelida). Серед багатоклітинних тварин у біотехнології використовують черв'яків типу Кільчасті черв'яки (Клас Малощетинкові черв'яки-олігохети). Олігохети – велика та ще недостатньо вивчена група тварин, поширених переважно в ґрунті та прісних водоймах. Все черв'якоподібне тіло 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.

Одними із найбільш відомих представників олігохет є дощові черв'яки (рис. 11). Дощові черв'яки та інші ґрунтові малощетинкові черви відіграють надзвичайно важливу роль у процесах ґрунтоутворення. Дощові черв'яки живляться відмерлими рештками рослин, зтягуючи їх у свої ходи, і там збагачують ґрунт органічними речовинами. У процесі перетравлення залишок рослин у кишечнику черв'яків формуються органічні речовини, з яких утворюється гумус. Дощовий черв'як *Eisenia foetida* (гнойовий) часто зустрічається у купах гною чи компосту. Він переробляє органічну масу на високоєфективне добриво (біогумус). Вченими штучно створена високопродуктивна порода цих тварин – “каліфорнійський черв'як”.

Вермікультивування – перспективна галузь біотехнології, в якій використовуються властивості каліфорнійського черв'яка: одержання його біомаси, біогумусу, біогумату (витяжка з біогумусу, яка містить комплекс біологічно активних речовин, зокрема фітогормонів).

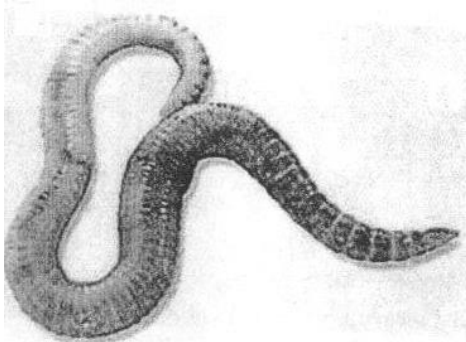


Рис. 11. Біотехнологічний об'єкт – червоний каліфорнійський черв'як

Завдання:

Виготовити тимчасові препарати і розглянути за допомогою мікроскопічного методу представників різних груп мікроорганізмів (дріжджових клітин, цвілевих грибів: *Mucor*, *Aspergillus*; водоростей: *Microcystis*, *Chara*; найпростіших: сувойки), а також візуально розглянути представників лишайників, шапкових грибів. Зробити рисунки та їх підписи з визначенням основних структурних (морфологічних) компонентів об'єктів біотехнології. Визначити зв'язок морфологічних особливостей мікроорганізмів з речовинами, які вони продукують, їх використання у біотехнології. Скласти таблицю, яка характеризує ці особливості (зразок схеми пропонується).

Таблиця 1

Порівняльна характеристика біооб'єктів-продуцентів біотехнологічної продукції

№ п/п	Біооб'єкт-продуцент	Фізіологічні особливості (за трофічним фактором)	Використання у біотехнологічних процесах
1			
2			
3			

Звіт з виконаної роботи здати викладачу.

Контрольні питання для самоперевірки

1. Поняття про мікроорганізми, їх значення як об'єктів-продуцентів в біотехнології.
2. Біотехнологічні переваги мікроорганізмів-продуцентів різних біотехнологій в екології.
3. Характеристика біоб'єктів-продуцентів за рівнями організації.
4. Внесок Луї Пастера та Антонія Левенгука у розвиток науки про мікробів.
5. Різноманітність мікроорганізмів: віруси, фаги, бактерії, водорості, гриби, найпростіші.
6. Природні середовища мешкання мікроорганізмів.
7. Елементи живлення мікроорганізмів: автотрофи, гетеротрофи.
8. Значення мікроорганізмів для розвитку біотехнологічних наук.
9. Шкода, яку наносять мікроорганізми.
10. Використання мікроорганізмів для здобуття екологічно безпечної продукції для народного господарства.

Практична робота № 2

Тема: Основні види поживних середовищ, що використовуються в біотехнології

Мета роботи: ознайомитися з різними видами поживних середовищ (субстратів) в біотехнологічних процесах, які отримують на основі відходів рослинної сировини.

Матеріал та обладнання: біологічні матеріали: соняшникове лушпиння, різні види соломи, відходи деревини, водопровідна вода; агаризовані поживні середовища у пробірках і чашках Петрі.

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

Субстрати вміщують необхідний набір різних хімічних елементів, які беруть участь в обміні між клітинами мікроорганізмів та середовищем. Вони є джерелами живлення та енергії для біооб'єктів.

Розвиток мікроорганізмів здійснюється, 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. Невіддільною частиною субстрату є вода як розчинник поживних сполук.

Поживні середовища можуть бути з не точно визначеним складом, тобто включати біогенні (рослинні, тваринні, мікробні) речовини – **натуральні середовища**; можуть включати хімічні сполуки з визначеною кількістю, співвідношенням компонентів – **синтетичні середовища**, а також можуть бути **напівсинтетичними** (до натурального субстрату додаються речовини відомої хімічної природи). Найбільш поширеними є напівсинтетичні субстрати.

Компонентний склад субстратів залежить від потреб біооб'єкту у поживних речовинах (*автотрофи* синтезують органічні речовини клітин з CO₂ та H₂O з утилізацією сонячної енергії, а *гетеротрофи* потребують органічні джерела карбону та (або) енергії).

У біотехнологічних процесах використовуються різні за фізичним станом поживні середовища (твердофазні, рідинні, газоподібні).

В практику біотехнології для виділення мікроорганізмів з природних місць їх існування введені **елективні** (вибіркові) середовища, які забезпечують переважний розвиток необхідної групи мікроорганізмів.

З техніко-економічних позицій субстрат – це сировина для отримання цільового продукту. Сировина повинна бути недефіцитною, дешевою, відновлювальною та доступною.

Приклади поживних субстратів, які широко використовуються у біотехнології наведені в табл. 2.

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

Таблиця 2

Основні види субстратів 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. Вуглеводені		
Алкани (C ₁ -C ₉ ; C ₁₀ -C ₂₀ і більш	Джерело "С" та енергії	Нафта, газовий конденсат

4. Азотвмісні сполуки		
Сульфат амонію Аміак Сечовина Гідрофосфат амонію	Джерело "N" — " — — " — Джерело нітрогену і фосфору	Мінеральні речовини
5. Субстрати невизначеного складу		
Меляса Сульфатні щолока Рослинні гідролізати Рослинні та тваринні жири Дріжджовий екстракт Соева мука	Джерело "С" та енергії Джерело "С" та енергії, мінеральних солей Джерело карбону, енергії — " — Джерело С, N, енергії, мінеральних солей — " —	Побічний продукт цукрового виробництва Деревина, побічний продукт її переробки Однорічні рослини, деревина (гідроліз) Рослинна та тваринна сировина Півні або пекарські дріжджі Соеві боби після видалення олії

Варіанти рецептур поживних середовищ для культивування мікроорганізмів у біотехнологіях.

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

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

– м'ясо-пептоний бульон (МПБ). Основою є водний екстракт м'яса, до якого додається 1% пептону (продукту неповного розщеплення білків), 0,5% NaCl. МПБ стерилізують при 1 атм 20 хвилин.

– дріжджове середовище. Основою є дріжджова вода (70-100 г свіжих пресованих або 7-10 г сухих дріжджів 30 хвилин кип'ятять з 1 л води, потім фільтрують і додають мінеральні солі (0,1% K_2HPO_4 , 0,5% NaCl). Стерилізують при 0,5 атм 20-30 хвилин.

– картопляне середовище, яке готується шляхом відвару картоплі (200 г картоплі на 1 л води) та ін.

2. Синтетичні субстрати:

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 субстрати:

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

Завдання:

Розглянути, зробити рисунки різних субстратів для культивування біологічних об'єктів. Зробити підписи рисунків. Вивчити основні компоненти (джерела енергії) у складі живильних середовищ, їх значення для продуцентів біотехнологічної продукції. Вирішення завдань за картками.

Скласти таблицю з характеристикою досліджених видів сировини, яка використовується для виготовлення живильних середовищ у біотехнології (зразок схеми пропонується табл. 3).

Таблиця 3

Результати аналізу видів сировини для отримання поживних середовищ

№ п/п	Вид сировини	Поживні речовини субстрату	Біотехнологічне призначення
1			
2			
3			
4			

Звіт з виконаної роботи здати викладачу.

Контрольні питання для самоперевірки

1. Назвати основні види субстратів на основі відходів для культивування біоб'єктів-продуцентів.
2. Поняття "поживне середовище".
3. Натуральні поживні середовища. Приклади.
4. Синтетичні поживні середовища. Приклади.
5. Напівсинтетичні поживні середовища. Приклади.
6. Найбільш поширені речовини – джерела живлення та енергії для біоб'єктів-продуцентів.
7. Автотрофні організми в біотехнології.
8. Гетеротрофні організми в біотехнології.
9. Екологічний аспект використання поживних середовищ в біотехнології.

Практична робота № 3

Тема: Сучасні методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів-продуцентів

Мета роботи: знайомство з особливостями методів мікроскопічного дослідження мікроорганізмів-продуцентів біотехнологічної продукції. Опанування методів підготовки препаратів живих і фіксованих пофарбованих

клітин мікроорганізмів та проведення мікроскопічного дослідження прижиттєвих препаратів мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: мікроскоп МІКМЕД-1, піпетки на 1-2 мл, бактеріологічна петля, пінцет, тонкі предметні й покривні скельця, спиртівка (брикети сухого пального), кювета з містком для фіксованих препаратів, розчини метиленового синього (1:40), фуксину основного, генціанвіолету, імерсійна олія, бензин, серветки, фільтрувальний папір, дезінфікуючий розчин, дистильована вода, кефір з молочнокислими бактеріями *Streptococcus lactis*, настій біогумусу з бактеріями *Bacillus subtilis*, суспензія добової культури дріжджів *Saccharomyces cereviceae*, цвілеві гриби (*Mucor*; *Penicillium*; *Aspergillus*), наочні препарати сухих та законсервованих шапкових грибів (*Pleurotus ostreatus*), водорості у пробах річної води (*Micrococcus*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Chara*), застійна вода (мул) з представниками найпростіших (*Protozoa*).

Методи мікроскопічного дослідження препаратів мікроорганізмів

Метод «роздавленої краплі». На чисте знежирене предметне скло мікробіологічною петлею наносять краплю суспензії мікроорганізмів. Якщо в культурі розвилось дуже багато бактерій, її розводять водою. Покривне скло ставлять на ребро з краю краплі і поступово опускають на неї. Між стеклами не повинно залишатися пухирців повітря, які заважатимуть мікроскопії. Крапля повинна бути невеликою, щоб після «роздавлення» рідина не виступала за край покривного скла. Препарат розглядають із сухою системою.

Метод «висячої краплі». Препарат «висяча крапля» використовують для виявлення рухливості м/о. Крім того, можна довгостроково спостерігати за життєдіяльністю м/о: розмноженням, утворенням і проростанням спор.

Для готування препарату невелику краплю суспензії мікроорганізмів наносять на покривне скло, перевертають його краплею вниз і поміщають на спеціальне предметне скло з поглибленням (лункою) у центрі. Крапля повинна вільно висіти, не торкаючись країв і дна лунки. Край лунки попередньо змащують вазеліном. Крапля виявляється герметично замкненою у вологій камері, що дозволяє багатоденне спостерігання за об'єктом.

Препарати розглядають під мікроскопом, злегка затемнюючи поле зору; конденсор трохи опускають, надходження світла регулюють увігнутих дзеркалом. З невеликим збільшенням знаходять край краплі, що буде чітко видний у затемненому полі зору. Край краплі пересувають у центр поля зору мікроскопа і переводять на велике збільшення, розширивши при цьому діафрагму. Більш чіткі результати можна одержати у мікроскопії у темному полі чи у фазовому контрасті.

Препарат «відбиток». Ці препарати є зручними для вивчення природного розташування клітин у колонії мікроорганізмів та особливо для дослідження форми спор і спороносіців актиноміцетів і грибів.

З агаризованої пластинки, на якій мікроорганізмів вирости суцільним газоном, вирізають скальпелем невеликий блок і переносять на предметне скло так, щоб поверхня з мікроорганізмів була звернена нагору. Потім до газону прикладають чисте покривне скло і негайно знімають, намагаючись не зрушити убік. Отриманий препарат поміщають відбитком униз у краплю води (можна в краплю метиленового синього) на предметне скло і розглядають під мікроскопом із сухою системою. Такий відбиток можна одержати і на предметному склі, якщо торкнутися їм поверхні колонії. Відбитки можна фіксувати й забарвлювати будь-яким способом.

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. У простому забарвленні мікроорганізмів застосовують якийсь один з основних анілінових барвників: метиленовий синій, основний фуксин, генціановий фіолетовий, кристалічний фіолетовий. При цьому профарбовується вся клітина.

Їх готування вміщує такі етапи: виготовлення мазка, висушування, фіксацію й забарвлення.

Виготовлення мазка. За допомогою стерильної бактеріологічної петлі чи піпетки нанести на знежирене предметне скло краплю суспензії мікроорганізму. Матеріал із густого живильного середовища взяти бактеріологічною петлею і внести його в краплю стерильної водопровідної води. Матеріал рівномірно тонким шаром розподілити на площі 1-2 см².

Висушування мазка. Висушити приготовлений мазок при кімнатній температурі у повітрі. Тонкий мазок висихає дуже швидко. Якщо висушування мазка уповільнене, препарат можна злегка нагріти в 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.

Фіксація. Фіксація переслідує кілька цілей: забезпечити прикріплення клітин до скла; зробити мазок більш сприйнятливим до забарвлення, оскільки мертві клітини забарвлюються краще, ніж живі; зробити безпечним подальші маніпуляції з мазком, що важливо в роботі з патогенними мікроорганізмами. Найпростіший і розповсюджений спосіб фіксації - термічна обробка. Після висушування мазок зафіксувати в полум'ї пальника. Тримаючи скло мазком нагору, тричі провести його через гарячу частину полум'я пальника. Щоб уникнути перегріву, час прямого впливу полум'я не повинний перевищувати 3-4 с. Крім жару фіксацію можна робити хімічними речовинами, для цього використовують 96%-ний етиловий спирт (час фіксації 5-10 хвилин), суміш Нікіфорова (спирт: ефір – 1:1; час фіксації 10-15 хвилин); ацетон (5 хвилин) та ін.

Забарвлення. Фіксований препарат помістити мазком нагору на місток із двох паралельних скляних паличок, з'єднаних гумовими трубками, що

знаходяться на стінках кювети чи кристалізатора. Нанести 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 доливати нові порції. Для одержання більш чистих препаратів барвник наливають на мазок, покритий фільтрувальним папером. По закінченні фарбування препарат промивають водою доти, поки стікаюча вода не стане безбарвною. Потім препарат висушують у повітрі і промокають фільтрувальним папером. Виконати мікроскопію з імерсією фіксованого та забарвленого препарату мікроорганізму.

Дослідження фіксованого препарату з імерсійним об'єктивом. Після встановлення освітлення приготуваного сухий пофарбований препарат спочатку розглядають із невеликим збільшенням під об'єктивом сухої системи (8×, 40×). Знайшовши найбільш удале місце на ньому, препарат закріплюють затисками на столику мікроскопа. Тубус мікроскопа піднімають і, повертаючи револьвер, встановлюють імерсійний об'єктив. Потім у центр препарату на мазок, не знімаючи з столика мікроскопа, наносять краплю імерсійної (кедрової) олії і, дивлячись збоку, обережно опускають тубус мікроскопа до занурення об'єктива в олію. Стежать за тим, щоб фронтальна лінза не торкнулася предметного скла і не одержала uszkodження. Після цього, дивлячись в окуляр, макрометричним гвинтом повільно піднімають об'єктив до появи в полі зору досліджуваного об'єкта. Фокус уточнюють за допомогою мікрометричного гвинта.

Після роботи кедрову олію негайно видаляють з об'єктива серветкою, що змочена очищеним бензином. Ксилол і спирт використовувати не рекомендується, тому що вони можуть викликати розклеювання лінз об'єктивів.

У правильно забарвленому і добре промитому препараті поле зору залишається світлим і чистим, а пофарбованими залишаються клітини мікроорганізмів.

Методи одержання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів

Розвинені у різних природних середовищах мікроорганізми, отримані від тварини, людини, чи рослини, чи іншого субстрату є **культурою**. Розвиток культури мікроорганізмів в рідкому середовищі призводить до утворення суспензії або осаду, плівки, **колонії** на твердому середовищі. Культивування за умов визначеної температури (у термостаті) називається **інкубацією**.

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

Чисті культури необхідно виділяти для вивчення фізіолого-біологічних особливостей розвитку мікроорганізмів (бактерій), а також для встановлення їх видової приналежності.

Чиста культура мікроорганізмів одного виду, що виділена з певного джерела і відрізняється від інших представників виду незначними змінами,

називається **штамом**. Чиста культура мікроорганізмів, що є потомством однієї єдиної клітини, називається **клоном**.

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 із різних властивостей: морфологічних, тинкторіальних, біохімічних (ферментативних), антигенних і т.п.

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

Метод Виноградського передбачає одержання **накопичувальних культур** мікроорганізмів певних фізіологічних груп і заснован на використанні елективних (виборчих) середовищ, що забезпечують переважний розвиток певних бактерій. Інші організми в цих умовах не можуть розмножуватися чи їх ріст буде дуже незначний.

Внесення клітин мікроорганізмів (зразка ґрунту, проби води) 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, кислотність середовища, температура, здатність до спороутворення та ін.

Підбираючи оптимальний склад живильного середовища та параметри культивування й інокуючи середовище якими-небудь природними субстратами, що містять різноманітні мікроорганізми, можна одержати **накопичувальну культуру** організмів. Вона характеризується певними фізіолого-біохімічними властивостями і є матеріалом для виділення **чистої культури** мікроорганізмів.

Метод Коха заснован 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 агаризоване сушло в колбі на водяній бані і розливають його в 3-4 стерильні чашки Петрі;
- мікроорганізми висівають і розподіляють шпателем Дригальського чи петлею, використовуючи техніку виснаженого штриха чи мазка (рис. 12) послідовно в 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 посіву чашки необхідно перевернути нагору дном і поставити в термостат із температурою, що сприятлива для даного мікроорганізму;

– інкубують посіви звичайно протягом 2-5 діб (у залежності від швидкості росту конкретних мікроорганізмів);

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

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

Усі операції з посівів 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.

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 – вакуумні скляні ексікатори.

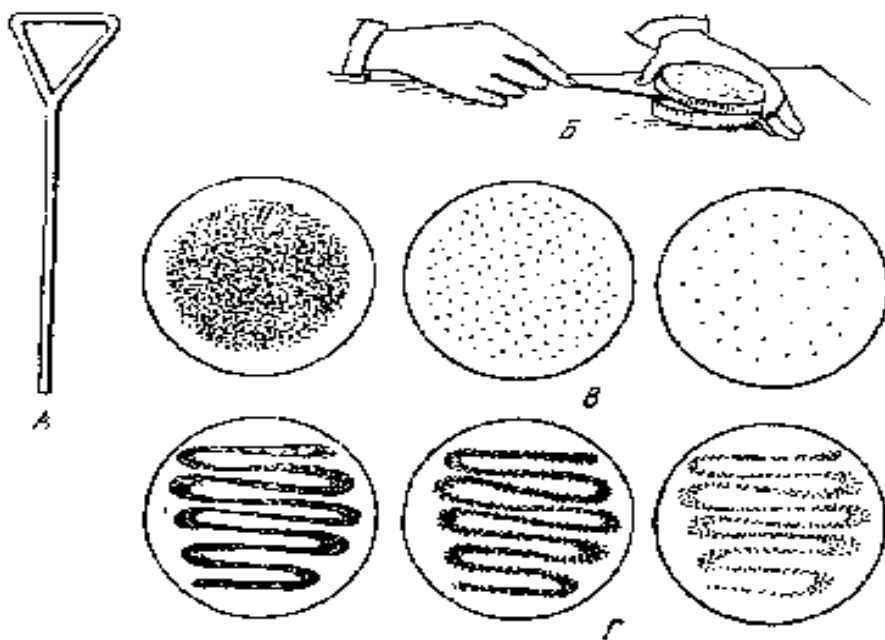


Рис. 12. Розсів мікроорганізмів на поверхню твердого середовища за методом Коха: а – шпатель Дригальського; б – розсів; в – ріст мікроорганізмів

після розсіву шпателем; г – ріст мікроорганізмів після розсіву петлею

Завдання: Зробити препарати заданих мікробіологічних об'єктів, використовуючи запропоновані способи, та провести мікроскопічне дослідження. Результати занести до протоколу у вигляді рисунка, на якому відобразити морфологічні і функціональні особливості біооб'єктів. Зробити висновки.

1. Дослідження морфологічних особливостей бактерій

1. Для вивчення морфології бактерій заздалегідь приготувати настої різних природних субстратів: м'яса, риби, білка яйця, сіна, борошна, овочів, фруктів і ін. Невелику кількість матеріалу подрібнюють, поміщають у склянку, на кінчику скальпеля додають трохи крейди і заливають водопровідною водою на 2/3 об'єму склянки. Склянку з настоем витримують у термостаті при температурі 25-28°C (чи в теплому приміщенні в темряві 3-5 днів). За цей час у середовищі накопичується маса різноманітних мікроорганізмів.

2. Приготувати та дослідити препарати живих клітин мікроорганізмів із природних субстратів такими методами:

– *методом «роздавленої краплі»* – із кисломолочних продуктів (ацидофіліну, чи кисляку кефіру) і ін.

– *методом «висяча крапля»* – із гнилого м'яса, риби, настою біогумусу.

В обох випадках можливе забарвлення об'єкта «прижиттєвими» барвниками – вітальне фарбування. Як прижиттєві барвники можна використовувати метиленовий синій, нейтральний червоний у концентраціях від 0,001 до 0,0001%.

– *методом «препарат-відбиток»* одного з представників актиноміцетів.

Оскільки міцелій актиноміцетів дуже тонкий і довгий, то для вивчення природного розташування клітин цих організмів варто приготувати препарати-відбитки. Покривне скло покласти на поверхню колонії, злегка притиснути до одержання чіткого відбитка, зняти за допомогою пінцета і помістити на предметне скло в краплю води відбитком униз. Паралельно приготовлений таким способом відбиток за аналогією з мазком бактерій висушують, фіксують жаром, забарвлюють і виконують мікроскопію, використовуючи об'єктив 90x з імерсією. Відбиток із такого ж способу можна одержати і на предметному склі.

– *методом виготовлення фіксованих та забарвлених препаратів:*

а) простим способом приготувати з рідини настоїв забарвлені препарати мікроорганізмів і зробити мікроскопію спочатку із сухим об'єктивом 40x, потім переглянути, використовуючи імерсійну систему (об'єктив 90x).

б) приготувати фіксований препарат-мазок із зубного нальоту.

Для цього на предметне скло нанести бактеріологічною петлею краплю стерильної водопровідної води, потім обережно знімають зубний наліт сірником, розтирають у краплі води та тонким шаром розподіляють на поверхні чистого знежиреного скла. Мазок підсушують у повітрі, фіксують і зафарблюють, розглядають з імерсією.

– виготовлення рідкого препарату: на добре знежирене предметне скло мікробіологічною петлею наносять велику краплю досліджуваної культури мікроорганізмів. Суміш ретельно перемішують і накривають покривним склом. Покривне скло обережно притискають до предметного смужкою фільтрувального паперу. Виконують мікроскопію препарату, користуючись об'єктивом 40x. На темному фоні туші виявляються прозорі зони капсул навколо різко обкреслених клітин.

– виготовлення висушеного препарату: краплю туші поміщають на добре знежирене предметне скло і змішують із краплею рідини, що містить бактерії. За допомогою покривного скла розподіляють мазок тонким шаром на поверхні предметного скла. Після того, як препарат висохне у повітрі, виконують його мікроскопію, користуючись об'єктивом МІ-90. У полі зору мікроскопа на загальному темному фоні туші чітко видно незабарвлені клітини мікроорганізмів різної форми, різних розмірів, розташовані в різноманітних сполученнях.

2. Дослідження морфологічних особливостей дріжджів, цвілевих грибів і найпростіших

1. Для вивчення морфології клітин дріжджів *Saccharomyces cereviceae*, приготувати з них препарат методом «роздавлена крапля» й виконати мікроскопію; також провести їхнє прижиттєве забарвлення метиленовим синім у розведенні 1:40. Розглянути клітини дріжджів, що купкуються й діляться.

Методи виявлення живих і мертвих мікробних клітин засновані на різному прониканні барвника, що характеризується різним фізіологічним станом клітини. Виявлення живих і мертвих клітин грибів проводять на вітальних (прижиттєвих) препаратах за допомогою метиленового синього. Для цього на предметне скло в краплю мікробної суспензії вносять краплю барвника метиленового синього, витримують не більш однієї хвилини, накривають покривним склом, забирають надлишок рідини фільтрувальним папером і виконують мікроскопію у прохідному світлі. Живі клітини, що не пропускають барвник, не забарвлюються, мертві клітини мають синій колір.

2. Розглянути колонії грибів *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* у мікроскоп з об'єктивом 8x безпосередньо у відкритій чашці Петрі.

3. Приготувати препарат «відбиток» одного з представників цвілевих грибів.

4. Приготувати препарат методом «роздавлена крапля» цвілевих грибів *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* і вивчити будову їх спорангіїв, конідій і конідієносіїв.

Міцелій грибів погано змочується водою, тому препарат готують у суміші спирту з гліцерином (1:1) чи води з оцтовою кислотою (1:1). Для дослідження грибів на добре знежирене предметне скло наносять краплю суміші. За допомогою двох препарувальних голок у цю краплю обережно переносять шматочок міцелію цвілевого гриба, обережно, не порушуючи структури міцелію, розправляють гіфи та органи, що плодоносять. Перед тим

як покласти покривне скло, розглянути препарат із невеликим збільшенням. Потім краплю накривають покривним склом і злегка придавлюють. Дослідження проводять у світловому мікроскопі з використанням об'єктивів 8× і 40× у затемненому полі зору, для чого звужують діафрагму чи опускають конденсор. Для кращої видимості будови міцелію в краплю під покривне скло можна додати невелику кількість фарби (одну краплю фуксину чи метиленової сині). Міцеліальні гриби можуть бути ідентифіковані з характерного спорношення.

У дослідженні культури мукової цвілі звернути увагу на наявність несептованого міцелію, від якого відходять несептовані спорангієносії з кулястим розширенням угорі (спорангієм), що наповнений ендоспорами.

У аспергілової цвілі гіфи септованого міцелію, переплітаючись один з одним, утворюють густу грибницю, від якої відходять одноклітинні конідієносії, що закінчуються віялоподібним розширенням (стерігми зі спорами – конідіями).

У пеніцилових цвілей від грибниці відходять септовані конідієносії, що закінчуються пензликами стеригм і конідій (спор).

5. Використовуючи демонстраційний матеріал, ілюстрації й фото, вивчити та зарисувати деяких представників сапрофітних і паразитарних форм найпростіших (*Protozoa*). Приготувати препарат методом «роздавлена крапля». Для цього мікробіологічною петлею на чисте знежирене предметне скло нанести краплю суспензії мікроорганізмів застійного мула. Покривне скельце ставлять на ребро з краю краплі і поступово опускають його на неї. Надлишок рідини знімають фільтрувальним папером.

Препарати, перш ніж вимити, поміщають у судину з дезінфікуючим розчином (2 %-ний розчин хлораміну, 3 %-ний розчин карболової кислоти, етилового або ізопропілового спирту).

Контрольні питання для самоперевірки

1. Які методи використовуються для мікроскопічного дослідження мікроорганізмів?
2. В чому полягає метод простого забарвлення препарату?
3. Які властивості біоб'єктів-продуцентів виявляються при їх мікроскопічному дослідженні?
4. Що таке накопичувальна культура мікроорганізмів?
5. Що таке чиста культура мікроорганізмів?
6. Яким методом проводиться дослідження морфологічних особливостей бактерій?
7. Яким методом проводиться дослідження морфологічних особливостей дріжджів, цвілевих грибів?

Практична робота № 4

Тема: Біооб'єкти мікробіоценозу ґрунту – продуценти антибіотиків

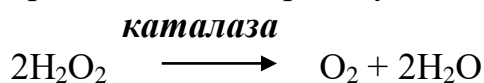
Мета роботи: виявити активність окисно-відновлювальної дії оксидоредуктаз мікроорганізмів ґрунту (груп родів *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Micromonospora* та ін.) за здатністю розкласти перекис водню.

Матеріали та обладнання: мікроскоп МІКМЕД-1, предметне й покривне скельце, піпетки, пінцет, скальпель, лопатка для сипких речовин, скляна паличка, фільтрувальний папір, дистильована вода, 3%-ний розчин перекису водню, ґрунт з горщика кімнатної рослини.

В межах едафотопу екологічною нішею мікроорганізмів, яка являє собою сукупність багатьох біологічних характеристик та фізичних параметрів, а також визначає умови існування того або іншого виду, є ґрунти. Ґрунтові мікроорганізми приймають участь в утворенні складових компонентів ґрунту, а саме завершують процес розкладання у ньому найбільш стійких частин рослинних залишків і гумусових речовин. Крім того, вони відіграють велику роль у формуванні популяції симбіотичної корисної мікрофлори ґрунтів. Так, представники групи нерухомих грампозитивних бактерій *Actinomycetales* – роду *Streptomyces* (понад 500 видів) є продуцентами антибіотиків (хлороміцетину, тетрацикліну, стрептоміцину, тощо), що пригнічує ріст патогенних мікробних груп.

У клітинах вищеназваних мікроорганізмів виявлено ферменти шести класів. Окисно-відновні реакції руйнування органічних речовин каталізують ферменти класу оксидоредуктаз, до яких відносяться дегідрогенази (анаеробні з переносником H_2 коферментами НАД або НАДФ та аеробні з переносником H_2 коферментами ФМН або ФАД), цитохроми, каталаза і пероксидаза.

Каталаза – двохкомпонентний фермент, що має у складі небілкову групу гематин (окиснена простетична група гемоглобіну крові). За участю каталази прискорюється реакція розщеплення перекису водню з утворенням кисню:



Пероксидаза широко зустрічаються у рослинах і каталізує окиснення органічних субстратів з активацією перекису водню, який діє як акцептор H_2 , і ініціює розклад H_2O_2 (окиснює феноли та деякі ароматичні аміни).

Дія ферменту каталаза у клітинах тварин та людини проявляється при промиванні порізів або ран перекисом водню. Відбувається ніби “кипіння”, тобто бурхливе виділення пухирів газу. Це і є наслідком розкладання перекису водню каталазою клітин крові (еритроцитів).

Каталаза Актиноміцетів, які асимілюють залишки целюлози, хітину та інших важко розкладаємих біополімерів, приймає участь в окисно-відновному процесі детоксикації перекису водню у ґрунтах.

Ґрунти екосистем є природним середовищем, з якого можна виділяти штами *Actinomycetales* та на їх основі далі отримувати накопичувальну

культуру, а потім – чисту, і використовувати її у заданому біотехнологічному процесі.

Ферментна активність мікроорганізмів сприяє процесу самоочищення та самовідновлення ґрунтів завдяки зв'язуванню токсичних важких металів шляхом хелатоутворення, тобто утворення міцних циклічних комплексів – *хелатів*. (з гр. *χελα* – клешня).

Завдання:

За допомогою ферментативної реакції окиснення органічних субстратів, в результаті якої спостерігається руйнування перекису водню на кисень та воду, визначити присутність бактерій, що мешкають в ґрунті.

Написати рівняння реакції, зарисувати, дати пояснення.

Принцип методу. Розщеплення перекису водню відбувається за участю каталази мікроорганізмів роду *Actinomyces*, що мешкають у ґрунті. Про активність каталази свідчить виділення бульбашок O_2 на поверхні ґрунту.

Хід дослідження: на предметне скельце лопаткою для сипких речовин відібрати невелику кількість ґрунту з горщика, в якому росте герань. За допомогою піпетки на відібрану пробу нанести краплю H_2O_2 . Якісно за нормальними умовами спостерігати виділення кисню (бульбашок повітря).

Контрольні питання для самоперевірки

1. Назвати групи найбільш поширених ґрунтотриваючих мікроорганізмів.
2. Які властивості Актиномицетів забезпечують їм можливість участі в детоксикації ґрунтів?
3. Продуктантами яких біологічно активних речовин є мікроорганізми роду *Actinomyces*?
4. Які токсичні речовини розкладаються ферментами каталаза, пероксидаза?
5. Біохімічна та екологічна роль мікроорганізмів, що мешкають у ґрунті.
6. Що являють собою хелатні сполуки?

Практична робота № 5

Тема: Системи лабораторних та промислових біореакторів, їх призначення

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

Матеріали та обладнання: плакати, фотокартки, конспекти лекцій, лабораторний посуд та пристрої.

Вибір біореактору – ферментатору є третьою стадією біотехнологічного процесу.

Біореактори – це спеціальні системи, якими оснащуються біотехнологічні процеси і які використовуються для культивування біомаси та синтезу вторинних метаболічних сполук (продуктів обміну). 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. 13):

- 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, апаратури 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.

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.

Важливу роль при культивуванні біомаси відіграє безперервне перемішування, яке забезпечує добру аерацію та перешкоджає висадженню клітин біооб'єкту. В лабораторних умовах перемішування досягається при застосуванні качалочних та ролерних установок. У промислових – за допомогою багатоярусних мішалок (рис. 13).

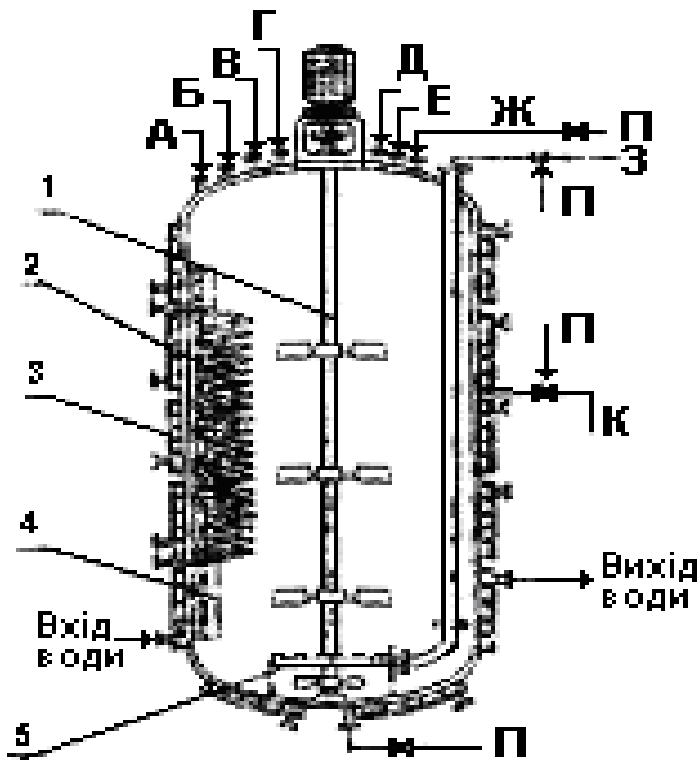


Рис. 13. Ферментатор періодичної дії:

- А – загрузочна лінія;
- Б – видалення відпрацьованого повітря; В – подача стерильного стиснутого повітря;
- Г – подача пару; Д – лінія введення додаткових речовин;
- Е – подача піногаснику;
- Ж – подача миючого розчину;
- З – подача повітря у барботер;
- К – відбір проб; П – пара
- 1 – турбінна трирядна мішалка;
- 2 – змійовик; 3 – секційна охолоджуюча рубашка;
- 4 – відбиваюча перегородка;
- 5 – барботер

Завдання:

Розглянути за допомогою наочного матеріалу різні види біореакторів (промислові: ферментатор періодичної дії, біореактор для твердофазного культивування, дріжджезрощувальний апарат з дифузором та пропелером для інтенсифікації циркуляції, колонний вертикальний ферментатор; лабораторні: термостат, качалочні установки, бокси). Зарисувати схематично приклади промислових та лабораторних біореакторів (колончатого типу, термостат, качалочного типу). Позначити основні частини біотехнологічних реакторів. Принципові особливості біореакторів описати за наступною схемою (табл. 4).

Таблиця 4

Характеристика біореакторів та їх призначення в біотехнології

Види біореакторів	Біотехнологічні призначення
<u>лабораторні</u> : (навести приклади розглянутих видів)	
<u>промислові</u> : (навести приклади розглянутих видів)	

Звіт з виконаної роботи здати викладачу.

Контрольні питання для самоперевірки

1. Принципи оснащення біотехнологічних виробництв.
2. Поняття про корозію.
3. Поняття про біопшкодження.
4. Системи біореакторів, їх призначення.
5. Класифікація біореакторів за принципом перемішування.
6. Принцип масштабування біотехнологічних процесів.
7. Класифікація біореакторів за режимом роботи.
8. Класифікація біореакторів за умовами культивування.
9. Приклади біореакторів.
10. Призначення системи аерації.
11. Призначення системи перемішування.
12. Призначення системи теплообміну.
13. Принцип асептики у біотехнології.
14. Призначення системи контролю у біореакторах.

Рекомендована література

1. Біотехнології в екології : навч. посібник / А.І. Горова, С.М. Лисицька, А.В. Павличенко, Т.В. Скворцова. – Д. : Національний гірничий університет, 2012. – 184 с.
2. Промислова мікробіологія: навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш;– Львів : Львів. нац. ун-т ім. І.Франка, 2009. – 256 с.
3. Біотехнологія: навч. посіб. / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль; ред.: М. І. Гиль. -Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.
4. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
5. Промислова мікробіологія Харчова і агробіотехнологія / І.В. Бондар, В.М. Гуляєв // Навч. посіб. для студ. спец-ті “Промислова біотехнологія.”. Дніпродзержинськ ; ДДТУ, 2004. – 280 с.
6. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості (3 томи). – Львів : Вид-во Національного університету „Львівська політехніка”, 2004. – 252 с.
7. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС, 2004. 296 с.
8. Харчова біотехнологія: підручник / Т. П. Пирог, М. М. Антонюк, О. І. Скроцька, Н. Ф. Кігель; Нац. ун-т харч. технологій. – К. : Ліра-К, 2016. – 407 с.
9. Юлевич О. І. Біотехнологія : навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М.І. Гиль. – Миколаїв: МДАУ, 2002. – 476 с.
10. Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв: навч. посіб. для студ. напряму "Фармація" і "Біотехнологія" ВНЗ / М. В. Стасевич, А. О. Милянч, І. О. Гузьова, І. Р. Бучкевич, Р. Я. Мусянович; ред.: В. П. Новіков; Нац. ун-т "Львів. політехн.", Нац. фармац. ун-т. – Вінниця : Нова Книга, 2012. – 407 с.

ГЛОСАРІЙ ОСНОВНИХ ТЕРМІНІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ГАЗУЗІ

- Адсорбція** – поверхневе поглинання якої-небудь речовини із газоподібного або рідинного середовища.
- Автотрофи** – організми, які здатні синтезувати із неорганічних речовин органічні сполуки з використанням сонячної енергії або енергії хімічних реакцій (як джерело карбону використовують CO_2).
- Аерація** – насичення середовища повітрям, киснем.
- Аеробні організми** – організми, які є життєздатними тільки в середовищах, що містять незалежний молекулярний кисень.
- Амінокислоти** – клас органічних речовин, які вміщують карбоксильну ($-\text{COOH}$) та аміногрупу ($-\text{NH}_2$) і володіють властивостями як кислот, так і лугів.
- Анаеробні організми** – організми, які є життєздатними у безкисневому середовищі.
- Антибіотики** – речовини біологічного походження, які здатні знищувати мікроорганізми або пригнічувати їх ріст.
- Антигени** – складні органічні речовини (білки, полісахариди або ін.), які сприймаються організмом як чужорідні і які здатні при потраплянні в організм людини або тварини викликати імунну реакцію (утворення антитіл).
- Антитіло** – складні білки – імуноглобуліни, які утворюються імунною системою організму людини або тварини у відповідь на введення антигену і які здатні вступати з ним у специфічну реакцію.
- Біотехнологія** – сукупність промислових методів, які використовують живі організми та біологічні процеси для виробництва цінних для народного господарства продуктів.
- Біотехнологічний процес** – промисловий процес, який включає три основні стадії: підбір біооб'єкту; культивування; виділення, очистку та модифікацію цільового продукту.
- Біотехнологічні продукти** – речовини, які утворюються в результаті життєдіяльності об'єктів біотехнології.
- Біореактор** – спеціальні технічні системи, якими оснащуються біотехнологічні процеси і які використовуються для культивування біомаси та синтезу вторинних метаболічних сполук (продуктів обміну).
- Біомаса** – клітинна маса живих організмів (популяцій, видів, групи видів, суспільств в цілому) в конкретних екологічних умовах.
- Біогаз** – горючий газ, який одержано з твердих та рідинних відходів, в тому числі з відходів тваринництва, стічних вод тощо, а також при зброджуванні спеціально зрощуваних водоростей або ін. організмів із значним приростом біомаси.
- Бродіння** – анаеробний ферментативний окислювально-відновний процес отримання енергії, в якому від субстрату (донора) відщеплюється водень (або електрони) та переноситься на продукти –

низькомолекулярні органічні речовини (акцептори) за певними умовами.

Вакцини – препарати, які одержані з живих (послаблених, знешкоджених) або мертвих мікроорганізмів, окремих компонентів мікробних клітин та продуктів їх життєдіяльності, які використовуються для імунізації людини або тварин з метою профілактики та лікування.

Випарювання – метод виділення біомаси із культуральної рідини – метод її зневоднення (концентрування біомаси).

Висадження – метод виділення біомаси із культуральної рідини за допомогою спеціальних хімічних речовин (стимуляція агрегації клітинної біомаси).

Генетика – наука, яка вивчає механізми і закономірності спадковості та мінливості організмів, методи управління цими процесами.

Генотип – сукупність генів організму.

Гетеротрофи – організми, які використовують для побудови клітин органічні речовини, що продуковані іншими видами організмів, як джерело карбону застосовують готові органічні сполуки.

Дезинтеграція – метод руйнування цілісного організму (клітин) на складові частини.

Детермінація клітинного матеріалу – здатність біологічного матеріалу при штучній пересадці на чуже місце у зародиші перетворитися в орган, який з нього утворюється в нормі.

Експресія гену – реалізація генетичної інформації, яка закодована у послідовності нуклеотидів молекули ДНК; складається з 2-х основних стадій – транскрипції та трансляції.

Екстракція – метод здобування продукту за допомогою екстрагентів (розчинників), які здатні його поглинати.

Еукаріоти – організми (людина, тварини та рослини), клітини яких містять оформлене ядро з двохшаровою мембраною та хромосомами.

Імобілізація – метод створення тимчасової нерухомості (біооб'єкт в системі носія).

Імобілізовані клітини – клітини, які включені до яких-небудь органічних носіїв (гелів, мембран, волокна) або закріплені на поверхні носія.

Імунітет – несприйняття організму до інфекційних агентів та чужорідних речовин, його здатність захистити свою цілісність і біологічну індивідуальність.

Інокуляція – введення живих мікроорганізмів, інфікованого матеріалу, сироватки або ін. речовин у живильні середовища, в тканини рослин та тварин (людини).

Інтерферони – захисні білки, які синтезуються клітинами організму людини, тварин у відповідь на зараження їх вірусами.

Каллус (callous) – маса недиференційованих клітин, які утворюються при пошкодженні рослини; розвиваються при культивуванні на штучних середовищах одинокої клітини з додаванням стимуляторів росту (фітогормонів).

- Клон** – група клітин-нащадків (генетично ідентичних), що виникли нестатевим шляхом з однієї клітини.
- Контамінація** – забруднення живильного середовища сторонньою мікрофлорою.
- Кріоконсервація** – метод глибокого заморожування клітин з подальшим зберіганням у рідинному азоті (-196°C) або його парах (-150°C).
- Культуральна рідина** – водний розчин залишків живильного середовища та одержаних продуктів біосинтезу після етапу відділення біомаси.
- Ліофільне висушування** – метод консервації продуцентів шляхом заморожування розчину або суспензії клітин і подальшої сублімації (возгонки) у вакуумі.
- Масштабування** – процес перенесення біотехнологічного процесу з лабораторних умов до промислових.
- Метаболіти** – сполуки, які утворюються в процесі обміну речовин живої клітини.
- Метаболізм** – процес обміну речовин у живому організмі (сукупність біохімічних реакцій перетворення хімічних сполук у живому організмі).
- Мікробний синтез** – синтез корисних речовин за допомогою маси мікробних клітин.
- Моноклональні антитіла** - специфічні за структурою антитіла, які синтезовані на основі мієломних (пухлинних) клітин та імунних В-лімфоцитів; утворюють антитіла, що спрямовані на чужорідний антиген.
- Мутагени** – фактори (фізичні, фізико-хімічні, хімічні, біологічні), які здатні викликати мутації.
- Мутація** – природні або ті, що викликаються мутагенами (індуковані) зміни спадкових властивостей організму (його генотипу), які виникають в результаті перебудов або порушень у генетичному матеріалі організму, спадкова мінливість.
- Накопичувальна культура** – це культура, яка складається переважно з мікроорганізмів одного виду.
- Пастеризація** – процес знищення у живильних середовищах, продуктах безспорових бактерій шляхом тривалого (20-30 хв.) одноразового нагрівання у температурному режимі менше 100°C ($60-70^{\circ}\text{C}$).
- Поживне середовище (субстрат)** – джерело живлення та енергії для біооб'єктів-продуцентів, що вміщує необхідний набір різних хімічних елементів, які беруть участь в обміні між клітинами мікроорганізмів та середовищем.
- Поживні середовища елективні** – вибіркові середовища, які забезпечують переважний розвиток необхідної групи мікроорганізмів.
- Прокаріоти** – доядерні організми (бактерії та синьо-зелені водорості), клітини яких не мають зформованого ядра, а мають ядерний еквівалент (нуклеоїд – кільцеву замкнену молекулу ДНК).
- Протопласт** – вміст клітини (цитоплазма, органели) без клітинної мембрани.

- Селекція** – процес виведення нових та покращення існуючих сортів рослин, порід тварин та штамів мікроорганізмів шляхом штучного мутагенезу, відбору, гібридизації, генної та клітинної інженерії.
- Сепарація** – процес відділення біомаси від культуральної рідини (розподілення на складові частини).
- Стерилізація** – процес повного знищення у живильних середовищах, посуді, сухих матеріалах, у біореакторах живих мікроорганізмів та їх спочиваючих форм (спор) в умовах високих температур 100-120⁰С, надлишкового тиску, за часом (20-45 хв.).
- Суспензія** – суміш двох (або більше) речовин, з яких одне (тверде) розподілено у вигляді дрібних частинок у другому (в рідині) в завислому стані.
- Ультрафільтрація** – надфільтрація, метод відділення біомаси від культуральної рідини на мембранних фільтрах з визначеним розміром.
- Фаги** – неклітинні форми життя, ультрамікроби, які здатні розмножуватися та викликати за допомогою літичних ферментів лізис (розчинення) клітин живих організмів.
- Ферменти** – біологічні каталізатори, за хімічною природою – білки, обов'язково присутні в усіх клітинах живих організмів, прискорюють швидкість біохімічних реакцій.
- Фільтрація** – процес відділення нерозчинених речовин (біомаси) від рідини, в якій вони знаходяться, шляхом пропускання крізь пористу поверхню.
- Флотація** – один з способів виділення біомаси від культуральної рідини, який оснований на різній здатності до змочування водою частинок речовин (біомаса випадає до осаду або зпливає на поверхню).
- Чиста культура** – культура мікроорганізмів одного виду.
- Штам** – культура одного й того ж виду, яка виділена з різних субстратів та відрізняється незначними змінами властивостей.

ЗМІСТ

Правила техніки безпеки.....	8
Практична робота № 1. Об'єкти-продуценти біотехнології, їх класифікація: віруси, фаги, бактерії, найпростіші, водорості, гриби, вищі рослини	10
Практична робота № 2. Основні види поживних середовищ, що використовуються в біотехнології.....	21
Практична робота № 3. Сучасні методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів-продуцентів.....	25
Практична робота № 4. Біооб'єкти мікробіоценозу ґрунту – продуценти антибіотиків.....	33
Практична робота № 5. Системи лабораторних та промислових біореакторів, їх призначення	35
Рекомендована література.....	40
ГЛОСАРІЙ ОСНОВНИХ ТЕРМІНІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ГАЗУЗІ..	41
ЗМІСТ.....	42

Лисицька Світлана Майорівна
Горова Алла Іванівна

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації
до виконання практичних робіт з дисциплін «Біотехнологія», «Основи
промислової біотехнології» студентами спеціальності
161 «Хімічні технології та інженерія»

Друкується у редакційній обробці авторів

Підп. до друку 06.2021. Формат 30 x 42/4.
Папір офсет. Ризографія. Ум. друк. арк. 2,0.
Обл.-вид. арк. 2,2 . Тираж 6 пр. Зам. №

НТУ «Дніпровська політехніка»
49005, м. Дніпро, просп. Д. Яворницького, 19.