

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ЩОДО ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
«ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ДЕННОЇ ФОРМИ НАВЧАННЯ
ЗА НАПРЯМОМ 6.051401– «БІОТЕХНОЛОГІЯ»

КРЕМЕНЧУК 2017

Методичні вказівки щодо лабораторних робіт з навчальної дисципліни
«Загальна біотехнологія» для студентів денної форми навчання за напрямом
6.051401 «Біотехнологія»

Укладачі : д.б.н., проф. В. В. Никифоров
старш. викл. О. О. Никифорова

Рецензент: к.т.н., доц. А. В. Пасенко

Кафедра біотехнології та здоров'я людини

атверджено методичною радою Кременчуцького національного університету
імені Михайла Остроградського

Протокол №__ від_____2017 р.

Голова методичної ради

проф. В. В. Костін

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Перелік лабораторних робіт.....	6
Лабораторна робота № 1 Правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії. Спеціальні види лабораторного обладнання для проведення біотехнологічного процесу.....	6
Лабораторна робота № 2 Різноманітність об'єктів біотехнології, їх особливості.....	9
Лабораторна робота № 3 Приготування основних видів живильних середовищ, що використовуються у біотехнологічних процесах.....	13
Лабораторна робота № 4 Методи виділення кінцевого біотехнологічного продукту.....	17
Лабораторна робота № 5 Культивування аеробних мікроорганізмів.....	19
Лабораторна робота № 6 Культивування анаеробних мікроорганізмів....	24
Лабораторна робота № 7 Одержання чистих культур мікроорганізмів....	29
Лабораторна робота № 8 Контроль повітря виробничих приміщень біотехнологічних виробництв.....	37
Лабораторна робота № 9 Контроль якості води на біотехнологічних підприємствах.....	40
Лабораторна робота № 10 Санітарно-гігієнічний контроль на біотехнологічних підприємствах.....	44
2 Критерії оцінювання знань студентів.....	50
Список літератури.....	52

ВСТУП

Метою дисципліни є вивчення основних умов, особливостей і закономірностей культивування біологічних агентів (БА) – продуцентів біологічно-активних речовин (БАР), процесів біосинтезу цільового продукту, методів керування процесами біосинтезу, способів та прийомів промислової реалізації біотехнологічного процесу, методів контролю мікробіологічних та фізико-хімічних стадій виробництва, а також ознайомлення студентів із принципами розробки біотехнологій.

Освоєння дисципліни надає майбутнім інженерам-біотехнологам базові знання з технологічного втілення процесів мікробного синтезу на виробництві та в лабораторіях при розробці нових та вдосконаленні існуючих технологій.

Задачі вивчення дисципліни В результаті вивчення дисципліни студент повинен знати:

- класифікації біотехнологічних процесів та виробництв;
- стан та перспективи розвитку сучасної біотехнології;
- сфери застосування біотехнологій;
- основні групи продуктів біосинтезу та продуцентів БАР;
- сировинну базу та принципи створення поживних середовищ, що використовуються в біотехнології;
- основні стадії технологічного процесу виробництва БАР;
- принципи математичного моделювання кінетики розвитку популяції біологічних агентів;
- способи реалізації процесів біосинтезу та виділення цільового продукту;
- значення та способи забезпечення асептики в біотехнологічній практиці;
- біотехнологічні основи асептики;
- основні правила організації сучасного мікробіологічного виробництва;
- основні документи нормативно-технічної документації.

Студент повинен вміти:

- знайти місце конкретної технології у системі відомих біотехнологій;
- вибрати продуцент БАР;
- обґрунтувати вибір технологічних способів та прийомів ведення біотехнології;
- вибрати типові способи та прийоми для реалізації біотехнології;
- розрахувати і вибрати основні технологічні параметри біотехнології;
- провести контроль основних показників ходу технологічного процесу і готової продукції;
- складати процесуальні та апаратурно-технологічні схеми стосовно певного продукту;
- отримати в лабораторних умовах окремі біологічно-активні продукти мікробного синтезу.

Студент повинен мати навички:

- роботи з культурами мікроорганізмів;
- складання та виготовлення поживних середовищ;
- проведення культивування продуцента в лабораторних умовах;
- виділення основного продукту (БАР) з культуральної рідини;
- мікробіологічного та фізико-хімічного контролю основних стадій технологічного процесу;
- роботи з науково-технічною документацією;
- складання принципів процесуальних та апаратурно-технологічних схем виробництва.

Перелік базових дисциплін, засвоєння яких необхідно для вивчення дисципліни: фізика, вища математика, загальна та неорганічна хімія, органічна хімія, біоорганічна хімія, біохімія і мікробіологія біологічних агентів.

1 ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Лабораторна робота № 1

Тема. Правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії. Спеціальні види лабораторного обладнання для проведення біотехнологічного процесу

Мета: ознайомитися з правилами техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії; з лабораторним посудом, який застосовується у біотехнологічних дослідженнях, оволодіти основними прийомами роботи з ним.

Матеріали, реактиви й устаткування: прилади загального та індивідуального користування, різний лабораторний посуд, гумова груша, дистильована вода.

Навчальні елементи: біооб`єкт, хлорамін, детергент.

Короткі теоретичні відомості

Загальні правила безпечної роботи в лабораторіях під час занять

1. Працювати в лабораторії необхідно в халаті, захищаючи одяг та шкіру від попадання роз`їдаючих реактивів та обсіменіння мікроорганізмами.
2. Кожний студент повинен працювати на закріпленому за ним робочому місці. Перехід на інше місце без дозволу викладача не допускається.
3. Робоче місце слід підтримувати в чистоті, не захаращувати його посудом і побічними речами.
4. Студентам забороняється працювати в лабораторії без присутності викладача або лаборанта, а також у невстановлений час без дозволу 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;
 - перевірити відповідність взятих речовин тим речовинам, які зазначені в методиці роботи.

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

8. Для виконання досліду 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 досліду потрібне нагрівання реакційної суміші, треба додержуватися передбаченого методичними вказівками способу нагрівання: на водяній бані, на електроплитці або на газовій горілці та ін. Сильно леткі пальні речовини небезпечно нагрівати на відкритому вогні.

10. Пролиті на підлогу та стіл хімічні речовини студенти знешкоджують і прибирають під керівництвом лаборанта (викладача) відповідно до правил.

11. При роботі в лабораторії слід додержуватись наступних вимог: виконувати роботу потрібно охайно, сумлінно, уважно, ощадливо, бути спостережливим, раціонально та правильно використовувати час, відведений для роботи.

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

Правила техніки безпеки при роботі з біоб'єктами

1. Необхідно чітко виконувати інструкції до лабораторних занять.

2. У лабораторії забороняється приймати їжу, пити воду.

3. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки інструментами.

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

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

Лабораторний посуд

Всі роботи у лабораторіях здійснюють з використанням різного посуду або приладів. Набір посуду залежить від характеру роботи, що проводиться. Хімічний посуд виготовляють з особливих сортів скла, яке відзначається хімічною стійкістю або термостійкістю, окремі види посуду виготовляють із кварцу, який має високу температуру плавлення (біля 1700–1800° С). Крім того, у хімічних лабораторіях застосовують посуд з фарфору, різних вогнестійких матеріалів або прозорих пластмас.

Скляний хімічний посуд є найбільш поширеним та підрозділяється 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, коливальна колба, фарфорова ступка з товкачиком.

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

Завдання до теми

1. Вивчити основні правила техніки безпеки при роботі в біотехнологічній лабораторії.

2. Зарисувати та вивчити функціональні принципи роботи спеціальних видів лабораторного посуду, обладнання для проведення біотехнологічного процесу. Для засвоєння теми лекції

Контрольні питання:

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 біотехнології.
13. Розвиток біотехнології в Україні.
14. Нові напрямки, які розвиваються на основі біотехнології.
15. Проблеми біотехнології.
16. Першорядні завдання біотехнології.

Література: [1, с. 4–8; 2, с. 3–5; 3, с. 5–6; 4, с. 4–6; 5, с. 4–5; 9, с. 4–6.]

Лабораторна робота № 2

Тема. Різноманітність об'єктів біотехнології, їх особливості

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

Матеріали, реактиви й устаткування: суспензія добової культури дріжджів, плісняві гриби, наочні препарати сухих та законсервованих шапкових грибів, водорості у пробах р. Дніпро (мікроцистіс, хлорела, хара), живі лишайники; застійна вода (мул), яка містить найпростіші (*Protozoa*); мікроскоп МБР-1, препарувальна голка, предметні і покривні скельця, пінцет, піпетка, скальпель, таблиці, рисунки, фотокартки.

Навчальні елементи: фаг, прокаріоти, акаріоти, еукаріоти, трансгенні рослини, клітинні культури, біогумус, біогумат, моноклональні антитела.

Короткі теоретичні відомості

Об'єктами біотехнології є віруси, фаги, бактерії, гриби (мікро- і макроміцети), водорості, протозойні організми (найпростіші), черв'яки, клітини (тканини) рослин, тварин, людини. Перші описи мікроорганізмів з'явилися ще наприкінці XVII століття. Їх зробив голландський вчений Антоніо Ван Левенгук за допомогою мікроскопа. Світ мікроорганізмів включає значну різноманітність форм, яким присущі малі розміри – від десятих долей мкм (мікромметр) до десятків, сотен мкм.

Мікроорганізмами вважаються живі об'єкти, розміри яких не перевищують 0,2 мм. Більшість живих об'єктів біотехнології складають мікроорганізми, які відносяться до 3 надцарств: без'ядерні (акаріоти), доядерні (прокаріоти), ядерні (еукаріоти); 5 Царств: віруси, бактерії, рослини, тварини, гриби.

Перевага мікроорганізмів, як об'єктів біотехнології, полягає в наступному:

- малі розміри (морфологічні особливості);
- активність (висока швидкість росту на живильних середовищах);
- простота геному;
- гнучкість обміну речовин;
- здатність добре пристосовуватися до умов зовнішнього середовища (екологічний фактор).

Положення мікроорганізмів у живій природі

До мікроорганізмів у біотехнології існують наступні вимоги:

- висока швидкість росту;
- стійкість до зараження сторонньою мікрофлорою;
- використання для життєдіяльності дешевих, доступних, нехарчових субстратів.

Різноманітні галузі застосування біотехнологічної продукції базуються на

основі біооб'єкт – її продуцентів:

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

– **бактерій**: отримання кормового білка на різних субстратах, біогазу, одержання вітамінів (B2, B12), 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 очищенні 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 24 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 у різних організмах**.

Завдання до теми

1. Виготовити тимчасові препарати і розглянути за допомогою мікроскопічного методу представників різних груп мікроорганізмів (дріжджових клітин, пліснявих грибів: *Mucor*, *Aspergillus*; водоростей: *Microcystis*, *Chara*; найпростіших: сувойки), а також візуально розглянути представників лишайників, шапкових грибів.

2. Зробити рисунки та їх підписи з визначенням основних структурних (морфологічних) компонентів об'єктів біотехнології.

3. Визначити зв'язок морфологічних особливостей мікроорганізмів з речовинами, які вони продукують, їх використання у біотехнології.

4. Скласти таблицю, яка характеризує ці особливості:

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

Контрольні питання

1. Поняття про мікроорганізми, їх значення у природі.
2. Еукаріоти та прокаріоти.
3. Історія відкриття мікроорганізмів.
4. Внесок Л. Пастера та А. Левенгука у розвиток науки про мікробів.
5. Різноманітність мікроорганізмів: віруси, фаги, бактерії, водорості, гриби, найпростіші.
6. Головні особливості мікроорганізмів.
7. Живлення мікроорганізмів: автотрофи, гетеротрофи.
8. Значення мікроорганізмів для розвитку біотехнологічних наук.
9. Шкода, яку наносять мікроорганізми.
10. Використання мікроорганізмів для здобуття цінних для народного господарства речовин.

Література: [1, с. 23–28; 2, с. 15–20; 3, с. 27–30; 6, с. 14–15; 8, с. 12, 18.]

Лабораторна робота № 3

Тема. Приготування основних видів живильних середовищ, що використовуються у біотехнологічних процесах.

Мета: ознайомитися з різними видами рослинної сировини для приготування живильних середовищ, які застосовуються у біотехнологічних процесах.

Матеріали, реактиви й устаткування: наочні біологічні матеріали: соняшне лушпиння, кукурудзяні качани, сіно, солома, відходи деревини, овес, ячмінь, водопровідна вода; агаризовані живильні середовища у пробірках та чашках Петрі, таблиці, конспекти лекцій.

Навчальні елементи: мікроелементи, мікроелементи, натуральні середовища, елективні (вибіркові) середовища, субстрат, напівсинтетичні субстрати.

Короткі теоретичні відомості

Культивування мікроорганізмів – це вирощування їх на штучних живильних 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 (живильному) 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.

Живильні 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'єкта 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 живильні 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. 3.1.

За участю наведених субстратів отримується різноманітна біотехнологічна продукція: харчовий та кормовий білок, ферментні препарати, органічні кислоти, спирти, амінокислоти, вітаміни тощо.

Варіанти рецептур живильних середовищ для культивування мікроорганізмів у біотехнологічних процесах.

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.

Таблиця 3.1 – Деякі поживні субстрати для біотехнологічних процесів

Субстрат	Призначення	Сировина для одержання субстрату
1. Вуглеводи		
Глюкоза	Джерело «С» та енергії	Крохмаль, целюлоза
Сахароза	Джерело «С» та енергії	Цукровий буряк, тростина
Лактоза	Джерело «С» та енергії	Молочна сироватка
Крохмаль	Джерело «С» та енергії	Картопля, кукурудза та ін.
Целюлоза	Джерело «С» та енергії	Рослинна сировина
2. Спирти		
Етанол	Джерело «С» та енергії	Цукрові субстрати рослинного походження, вуглеводні нафти
Метанол	Джерело «С» та енергії	Рослинні гідролізати
3. Вуглеводні Алкани		
Алкани (C ₁ –C ₉ ; C ₁₀ –C ₂₀ і більше)	Джерело «С» та енергії	Нафта, газовий конденсат
4. Азотвмісні сполуки		
Сульфат амонію	Джерело «N»	Мінеральні речовини
Аміак	Джерело «N»	
Сечовина	Джерело «N»	
Гідрофосфат амонію	Джерело нітрогену і фосфору	
5. Субстрати невизначеного складу		
Меляса	Джерело «С» та енергії	Побічний продукт цукрового виробництва
Сульфатні луки	Джерело «С» та енергії, мінеральних солей	Деревина, побічний продукт її переробки
Рослинні гідролізати	Джерело «С» та енергії, мінеральних солей	Однорічні рослини, деревина (гідроліз)
Рослинні та тваринні жири	Джерело «С» та енергії, мінеральних солей	Рослинна та тваринна сировина
Дріжджовий екстракт	Джерело «С», «N» та енергії, мінеральних солей	Пивні або пекарські дріжджі
Соева мука	Джерело «С», «N» та енергії, мінеральних солей	Соеві боби після видалення олії

– 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'ячать 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).

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.

Завдання до теми

1. Розглянути, зробити рисунки різних субстратів для культивування біологічних об'єктів. Зробити підписи рисунків.

2. Вивчити основні компоненти (джерела енергії) у складі живильних середовищ, їх значення для продуцентів біотехнологічної продукції. Вирішення завдань за картками.

3. Скласти таблицю з характеристикою досліджених видів сировини, яка використовується для виготовлення живильних середовищ у біотехнології:

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

Контрольні питання:

1. Субстрати для культивування біоб'єктів.
2. Поняття – живильне середовище.
3. Натуральні живильні середовища. Приклади.
4. Синтетичні живильні середовища. Приклади.
5. Напівсинтетичні живильні середовища. Приклади.

6. Поширені джерела живлення та енергії для біооб'єктів.
7. Автотрофні організми.
8. Гетеротрофні організми.
9. Використання живильних середовищ у біотехнології для культивування мікроорганізмів.

Література: [4, с. 53–59; 8, с. 20, 38, 56, 68; 11, с. 57–61; 12, с. 44–45.]

Лабораторна робота № 4

Тема. Методи виділення кінцевого біотехнологічного продукту

Мета: вивчити принципи відділення біомаси (дріжджової маси) від культуральної рідини та очищення біотехнологічних продуктів за допомогою методів осадження, фільтрації, центрифугування.

Матеріали, реактиви й устаткування: культуральна рідина з дріжджовою масою культури *Saccharomyces cerevisiae* після проведення спиртового бродіння, розчин залишкової кількості альбуміну у культуральній рідині після отримання кормового білка, центрифуга лабораторна КО-23, металеві стаканчики з металевими вкладишами, в яких вкладені газові фільтри, технічні ваги, хімічні стакани на 100 мл, мірний циліндр на 50 мл, скляні палички, скляні лійки, паперові фільтри, водяна баня, електроплитка.

Навчальні елементи: біомаса, культуральна рідина, термоденатурація.

Короткі теоретичні відомості

Після стадії культивування мікроорганізмів-продуцентів проводиться заключний технологічний етап – виділення із культуральної рідини та очищення кінцевого продукту. Для багатьох біотехнологічних виробництв заключний етап починається розподіленням двох фаз. Причому кінцевий продукт може знаходитися або у біомасі, або у культуральній рідині.

Біомаса – це клітинна маса живих організмів (популяцій, видів, групи видів, суспільств у цілому) в конкретних екологічних умовах. Процес виділення та очистки представляє собою ряд послідовних технологічних операцій, кількість яких росте з підвищенням ступеня чистоти кінцевого продукту. Для

запобігання можливих втрат готової продукції на стадіях виділення та очистки переважно використовуються такі прийоми розподілення, які не викликають пригнічення її активності.

Більшість мікроорганізмів-продуцентів біологічно активних речовин накопичують основну частину продуктів, які вони синтезують, у культуральній рідині.

Культуральна рідина – це складна багатофазна система, що вміщує від 1 до 5 % та більше сухої речовини у вигляді окремих мікробних клітин або міцелію, продуктів біосинтезу та залишків живильного середовища. Для виділення кінцевого продукту із такої складної суміші можна використовувати методи осадження та центрифугування.

1. Використовуючи металеві стаканчики з металевими вкладишами, в яких вкладені газові фільтри, перенести в них з колби культуральну рідину разом з дріжджовою масою культури *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Після цього стаканчики зрівноважити попарно на технічних вагах.

3. Зрівноважені стаканчики установити в роторі центрифуги хрест навхрест, загвинтити кришку ротора і закрити зовнішню кришку приладу. Режим центрифугування: 5 тис. об./хв., час 20 хв.

4. Відділену біомасу перенести з газового фільтра на годинникове скельце, відділену культуральну рідину злити в колбу та візуально визначити її прозорість, яка характеризує повноту та ефективність відділення дріжджової маси.

5. В циліндр налити 30 мл розчину альбуміну і перенести пробу у стаканчик об'ємом 100 мл.

6. Підігріти розчин на киплячій водянній бані протягом 10 хв.

7. В процесі термоденатурації зменшується розчинність альбуміну, утворюється осад білка, який необхідно відфільтрувати за допомогою скляної лійки з паперовим фільтром.

Завдання до теми

1. Опишіть принципи методів, які були використані на лабораторній

роботі, та їх застосування на стадіях біотехнологічних процесів, пояснити за наступною схемою:

Цільова речовина біотехнологічної стадії	Назва біотехнологічного виробництва	Метод, який використовується на біотехнологічній стадії
1.		
2.		

Контрольні питання

1. Які використовуються методи для виділення біотехнологічної продукції?
2. Поняття – біомаса.
3. Поняття – культуральна рідина.
4. Поняття – сепарація.
5. Показники, що характеризують чистоту кінцевого продукту.
6. Види обладнання, які використовуються на стадії видалення та очищення готового продукту.

Література: [1, с. 73–76; 3, с. 85–88; 4, с. 126–127; 10, с. 64–66; 13, с. 42.]

Лабораторна робота № 5

Тема. Культивування аеробних мікроорганізмів

Мета: ознайомитися з прийомами культивування мікроорганізмів в аеробних умовах.

Матеріали, реактиви й устаткування: колби, чашки Петрі, піпетки, колбострушувач, термостат, предметні та покривні скельця, набір для фарбування, спирт, сухе пальне, мікроскоп, поживні середовища, культура мікроорганізмів.

Навчальні елементи: культивування, облігатні аероби, глибинне культивування, аерація, ферментатор, хемостат (турбидостат).

Короткі теоретичні відомості

Вирощування мікроорганізмів на поживних середовищах називається

культивуванням (*cultus* по-латинському – вирощування). Культивування можна проводити поверхневим або глибинним, періодичним або безперервним методами, в аеробних або анаеробних умовах.

Спосіб культивування істотно впливає на застосовувані лабораторні моделі й прийоми. Велике значення має кінцева мета культивування: накопичення біомаси або одержання певного метаболіту (спирту, кислоти, антибіотика, ферменту, амінокислоти й т. і.).

Культивування аеробних мікроорганізмів. Метод поверхневих культур.

Поверхнєве культивування аеробів проводять на щільному або сипучому середовищі, а також у тонкому шарі рідкого середовища в скляному посуді із широким дном: чашках Петрі, колбах Виноградського, матрацах, кюветах. Засіяні посудини культивують при постійній температурі в термостатах або термостатних кімнатах (термокамерах).

Мікроорганізми розвиваються на поверхні середовища й використовують кисень безпосередньо з повітря. На рідких середовищах **облігатні аероби** ростуть у вигляді рясних плівок. Факультативні аероби (анаероби) розвиваються як у товщі рідкого середовища, утворюючи суспензії, пластівці, осад, так і на поверхні у вигляді тонкої плівки.

На щільних середовищах мікроорганізми ростуть у вигляді окремих колонії або суцільного газону. Поверхнєве культивування не в лабораторних умовах широко застосовують для одержання накопичувальних і чистих культур, їх зберігання, вивчення морфологічних, культуральних і біохімічних ознак мікроорганізмів. У промисловості метод поверхневих культур на рідких середовищах використають для одержання лимонної кислоти, на сипучих - для виробництва ферментні препаратів.

Глибинне культивування

Глибинне культивування мікроорганізмів може бути періодичним і безперервним. При періодичному процесі весь обсяг поживного середовища засівають посівним матеріалом і вирощування ведуть в оптимальних умовах

певний проміжок часу, поки не відбудеться накопичення потрібної кількості біомаси або цільового продукту. Для забезпечення росту аеробних культур у глибоких шарах рідини необхідне надходження кисню. Так як мікробні клітини здатні використати тільки розчинений кисень, а розчинність його невелика (4–7 мг/л), що витрачає акцептор електронів доводиться увесь час поповнювати.

Для аерації рідких культур використовують звичайне стерильне повітря або суміш кисню, азоту й діоксиду вуглецю. Примусову аерацію часто комбінують із механічним перемішуванням. Простим і доступним способом періодичного глибинного культивування є вирощування аеробних культур у суспендованому стані в рідкому середовищі, розлитому в невеликих обсягах у пробірки або колби різної місткості, які після засівання поміщають на качалки в термокамери. Качалки забезпечують безперервне струшування або обертання посудин частотою 100–300 об/хв.

Ступінь аерації культуральної рідини регулюють зміною частоти обертання (струшування) качалки, обсягом середовища в посудинах і застосуванням спеціальних колб із 4–8 втисненими усередину відросткам – відбійниками для розбризкування рідини. Ефективність насичення середовища киснем при такому методі можна виміряти з певною погрішністю сульфідним методом. Водяний розчин сульфіту, рівний обсягу поживного середовища поміщають у колби, аналогічні колбам, які використовуються для культивування, ставлять на качалки й через певні проміжки часу вимірюють кількість окисленого сульфіту.

Вирощування культур у колбах застосовують у лабораторній практиці для вивчення фізіологічних властивостей, установлення закономірностей їх росту залежно від складу компонентів середовища, з'ясування впливу факторів зовнішнього середовища; на життєдіяльність клітин, визначення продуктів метаболізму. Безперервне глибинне культивування ведуть у лабораторних ферментаторах. Це скляні апарати ємністю від 1 до 10 л, у яких забезпечується безперервна подача стерильного поживного середовища, аерація культуральної

рідини стерильним повітрям, автоматичне регулювання температури, рН, піногасіння й інших умов росту. З апарата безупинно витікає готова культуральна рідина. Процес безперервного вирощування у *ферментаторі* здійснюється по типам *хемостату* або *турбидостату*, які розрізняються способом підтримки культури в стані динамічної рівноваги.

У режимі хемостату ріст культури регулюють концентрацією фактора, що лімітує, у якості якого можуть бути використані джерела вуглецю, азоту, фосфору, ростових речовин, кисень, рН, температура.

Визначення припустимих меж варіювання факторами, що лімітують, має велике значення для керування процесом безперервного культивування у виробничих умовах, дозволяє економно витратити матеріали, ефективно використати генетичні можливості продуцентів, одержувати максимальний вихід цільового продукту.

У режимі турбидостату підтримують постійну концентрацію біомаси. Застосування із цією метою збагачених поживних середовищ дозволяє мікроорганізмам розмножуватися майже з максимальною швидкістю. Однак концентрація клітин при цьому невисока. Крім того, фотометричний контроль щільності клітин вимагає застосування прозорих середовищ, що можливо здійснити лише в лабораторних умовах.

Процес глибинного культивування може бути гомо- або гетерогенно-безперервним. При гомогенно-безперервному процесі у ферментаторі, де йде інтенсивне перемішування, всі параметри (концентрація поживних речовин, клітинний титр й ін.) постійні в часі. При гетерогенно-безперервному процесі застосовують декілька ферментаторів послідовно з'єднаних між собою. Поживне середовище подається в перший ферментатор, готова культуральна рідина виходить з останнього. У цьому випадку має місце безперервний потік поживного середовища але клітини не забезпечені постійними умовами росту (скільки апаратів, стільки й умов культивування). У таких умовах процес вирощування культури є безперервним лише в технологічному, але не у

фізіологічному аспекті. Спосіб знайшов широке застосування при одержанні спирту й дріжджів.

Хід роботи

1. Вимити, просушити та простерилізувати посуд в якому буде відбуватися культивування

2. Зварити поживне середовище (рідке та щільне), простерилізувати та стерильне розлити в посуд. Рідке середовище розлити по колбах, а щільне по чашкам Петрі.

3. Провести засів поживного середовища культурою аеробних мікроорганізмів.

4. Колби поставити в колбострушувач, а чашки Петрі в термостат. зверніть увагу на температурні режими процесу культивування.

5. Через добу провести огляд колб та чашок. Всі спостереження необхідно занести в лабораторний журнал.

6. Повторні огляди необхідно повторити на 2 та 3 дні.

Завдання до теми

1. Підготовка посуду

а). Який посуд було підготовлено.

б). Яким способом стерилізувався посуд та який час.

2. Підготовка поживного середовища

а). Яке поживне середовище було підготовлене (назва та склад) і в якій кількості.

б). В який посуд було розлито.

3. Засів середовища культурою мікроорганізмів

а). Яку культуру мікроорганізмів було використано.

б). Яким способом відбувся посів.

4. Культивування

а). Описати умови культивування.

б). Час культивування

5. Опис результатів експерименту

Результати експерименту занести в таблицю:

Поживне середовище	Щільне	
	Рідке	
Культура мікроорганізмів		
Умови культивування (температура, спосіб культивування та ін.)	Колби	
	Чашки Петрі	
Опис результатів		
I доба	Вид та форма колоній	
	Консистенція середовища	
	Вигляд культури під мікроскопом	
II доба		
III доба		

Контрольні питання:

1. Якими способами можна проводити культивування мікроорганізмів.
2. Наведіть приклади рідких та щільних поживних середовищ.
3. Назвіть переваги та недоліки поверхневого та глибинного культивування мікроорганізмів.
4. В чому різниця між гомо- та гетерогеннобезперервним культивуванням.

Література: [6, с. 63–65; 13, с. 37–38; 14, с. 44–45; 15, с. 57–58.]

Лабораторна робота № 6

Тема. Культивування анаеробних мікроорганізмів

Мета: ознайомитися з прийомами культивування мікроорганізмів в анаеробних умовах.

Матеріали, реактиви й устаткування: пробірки, чашки Петрі, термостат, анаеростат, парафін, вазелінова олія, хімічні поглиначі кисню, мікроскоп, предметні та покривні скельця.

Навчальні елементи: анаеростат, вакуум-ексикатор (та анаеростат).

Короткі теоретичні відомості

Вирощування анаеробів ведуть на поживних середовищах у звичайних або спеціальних пробірках, трубках, чашках Петрі при відсутності кисню. Активному росту анаеробів сприяє внесення в поживне середовище великої кількості посівної культури й наявність у навколишній атмосфері деякої кількості діоксиду вуглецю. Створити анаеробні умови можна фізичними, хімічними, біологічними й комбінованими методами.

Фізичні методи.

Видалення кисню з рідкого або щільного поживного середовища безпосередньо перед засівом культури досягається кип'ятінням або прогріванням пробірок на киплячій водяній бані протягом 15–20 хв і швидким охолодженням під струменем холодної води. Після засіву поверхню середовища, розлитого високим шаром, заливають шаром стерильної суміші вазелінової олії н-парафіна. Культивування анаеробів можна вести в спеціальних пробірках, з яких після засіву відкачують повітря за допомогою вакуум-насоса. Залишковий тиск у пробірках за манометром не повинен перевищувати 0,0016–0,002 МПа. Пробірки з культурами анаеробних мікроорганізмів, призначені для зберігання, запаюють у вузькому місці. Вирощування анаеробів на поживному агарі в чашках Петрі або в пробірках ведуть в анаеростатах.

Анаеростати – це вакуумні металеві або скляні ексикатори, які добре зберігають високе розрідження протягом тривалого часу. Металевий анаеростат являє собою циліндр із щільної герметично закритою кришкою. На кришці встановлені манометр і кран, за допомогою якого прилад приєднують до насоса.

Для росту строгих анаеробів засіяні чашки або пробірки встановлюють усередині анаеростату й знижують тиск до 0,0001 МПа. Потім кран перекривають й анаеростат поміщають у термостат або термокамеру. Скляні вакуумні ексикатори оснащені добре пришліфованою кришкою із краном на

шліфах для відкачки повітря. Пришліфовані поверхні, щоб уникнути проникнення повітря, покривають спеціальним вакуумною змазкою. На дно ексикатора для поглинання надлишку вологи поміщають 20–30 г хлориду натрію й 5–6 хлориду кальцію.

Створити анаеробні умови в анаеростатах або ексикаторах можна шляхом заміни повітря індиферентним газом (аргоном, гелієм, воднем, діоксидом вуглецю, азотом), пропущеним для стерилізації через фільтри. Хімічні методи. Зв'язування вільного кисню, який міститься в середовищі або в посудині для культивування анаеробів, роблять за допомогою хімічних речовин. Деякі з них поміщають поза середовищем, інші вводять у якості відновника безпосередньо в поживне середовище.

Хімічними поглиначами кисню є розчини пірогаллола з Na_2CO_3 , лужний розчин гідросульфїту натрію (дитіониту), металеве залізо й інші реактиви. Речовини, що з'єднують кисень повинні мати високу поглинаючу здатність. Наприклад, 1 мл, 20 % пірогаллолу в суміші з 1 мл насиченого розчину Na_2CO_3 очищають від кисню 220 см^3 повітря. Злегка зволожені хімічні поглиначі насипають на дно більших пробірок, у які на спеціальних підставках поміщають засіяні анаеробною культурою звичайні пробірки. Відкриті чашки Петрі зі злегка зволеним пірогаллолом із содою або гідросульфїтом натрію із содою ставлять на дно ексикатору. Заповнений засіяними чашками прилад герметично закривають кришкою, більші пробірки – гумовими пробками й поміщають у термостат.

Хімічним способом видаляють залишки кисню у вакуум-ексикаторах та анаеростатах, з яких частково викачане повітря. Відсутність кисню в приладах контролюють за допомогою індикатора. Готують 0,015 % водняний розчин метиленового синього й 0,5 % розчин глюкози, рН якого доводять до 10 розчином соди Na_2CO_3). Рівні обсяги розчинів змішують перед тим, як ставити в анаеростат. Знебарвлення розчину відбувається при тиску менш 0,005 Мпа.

У якості відновлювача, що додають у поживне середовища для культивування анаеробів, використовують органічні й неорганічні речовини:

редуючі цукри (глюкоза), речовини із сульфгідрильною групою (цистеїн, глутатіон), аскорбінову кислоту, пірокатехін, мурашиноокислий натрій, сульфід, сірководень, гідросульфід натрію, цитрат титану, а також деякі складні компоненти – пептон, шматочки печінки, м'язів, картоплі, яєчного білка.

Біологічні методи. Деякі анаеробні мікроорганізми можна вирощувати при доступі кисню разом з аеробами. У герметично закриту посудину поміщають 10–15 пробірок з посівами аеробних культур й одну пробірку з анаеробами.

Аеробні мікроорганізми енергійно поглинають кисень, виділяють CO₂ і створюють умови для росту анаеробів. Спільне вирощування симбіотичних видів аеробів й анаеробів ведуть на поверхні щільного середовища по методу Фортнера. У чашки Петрі товстим шаром наливають кров'яний агар.

Після застигання середовища стерильним пінцетом по діаметрі чашки вирізують рівчачки шириною 4–6 мм. Одну половинку агарової пластинки засівають культурою аеробів (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*), іншу – культурою анаеробів. Щоб припинити доступ кисню в чашку, щілину між дном і кришкою замазують парафіном, воском або пластиліном. Чашки поміщають у термостат.

Спочатку розвивається аеробний мікроорганізм. Коли зростаючі клітини поглинуть із чашки весь кисень, починається ріст анаеробів.

Комбіновані методи. Комбіновані методи являють собою сполучення вищевказаних способів видалення кисню.

Хід роботи

1. Вимити, просушити та простерилізувати посуд в якому буде відбуватися культивування

2. Зварити поживне середовище (рідке та щільне), простерилізувати та стерильно розлити в посуд. Рідке середовище розлити в пробірки, щільне в пробірки та чашки Петрі.

3. Одну пробірку з щільним середовищем розмістити під кутом для

застигання.

4. Провести засів поживного середовища культурою анаеробних мікроорганізмів.

а) Дві пробірки (з рідким та щільним середовищами) помістити в анаеростат, в якому розміщено киснепоглинач.

б) Чашки Петрі, краї яких змазані парафіном помістити в термостат.

в) Пробірки із скошеним середовищем після засіву залити вазеліновою олією та також помістити в термостат.

4. Через добу провести огляд пробірок та чашок.

5. Всі спостереження необхідно занести в лабораторний журнал.

6. Повторні огляди необхідно повторити на 2 та 3 дні.

Завдання до теми

1. Підготовка посуду

а). Який посуд було підготовлено.

б). Яким способом стерилізувався посуд та який час.

2. Підготовка поживного середовища

а). Яке поживне середовище було підготовлене (назва та склад) і в якій кількості.

б). В який посуд було розлито.

3. Засів середовища культурою мікроорганізмів

а). Яку культуру мікроорганізмів було використано.

б). Яким способом відбувся посів.

4. Культивування

а). Описати умови культивування.

б). Час культивування

5. Опис результатів експерименту

Результати експерименту занести в таблицю:

Поживне середовище	Щільне	
	Рідке	
Культура мікроорганізмів		
Умови культивування (температура, спосіб культивування та ін.)	Колби	
	Чашки Петрі	
Опис результатів		
I доба	Вид та форма колоній	
	Консистенція середовища	
	Вигляд культури під мікроскопом	
II доба		
III доба		

Контрольні питання:

1. Наведіть приклади мікроорганізмів – анаеробів.
2. В чому різниця між факультативними анаеробами та облігатними анаеробами?
3. Якими способами можна створити анаеробні умови для вирощування мікроорганізмів?

Література: [4, с. 134–136; 6, с. 115–118; 8, с. 77, 143, 265; 11, с. 72–75.]

Лабораторна робота № 7

Тема. Одержання чистих культур мікроорганізмів

Мета: опанувати методикою виділення чистих культур мікроорганізмів.

Матеріали, реактиви й устаткування: термостат, чашки Петрі, пробірки, бактеріологічні петлі, піпетки, поживні середовища, предметні та покривні скельця, фарбники, досліджувальний матеріал, мікроскоп, пальник, спирт, колби.

Навчальні елементи: чиста культура, гаплоїдна клітина, виснажуючий посів, мікроселектор, макрографія.

Короткі теоретичні відомості

В біотехнологічних виробництвах у якості одного з видів вихідних матеріалів використовують чисту культуру мікроорганізмів.

Чистою культурою (ЧК) називають популяцію, що представляє собою потомство однієї або декількох клітин одного виду мікроорганізмів. У генетичних дослідженнях користуються клонами – чистими культурами, отриманими від однієї спори або гаплоїдної клітини. У природних умовах різні об'єкти містять, як правило, змішану мікрофлору. Для діагностичних досліджень із метою з'ясування збудників псування харчових продуктів або рівня їх контамінації потрібне виділення чистої культури.

Методи виділення ЧК можуть бути прямими й непрямими. Прямі – засновані на виділенні під безпосереднім контролем через мікроскоп, наприклад метод Лінднера. Відомі методи виділення однієї клітини із суспензії мікроорганізмів за допомогою спеціальних приладів (мікроманіпулятор, мікроселектор Перфільєва) під контролем мікроскопа.

Однак найбільше розповсюдженим способом виділення чистих культур є непрямі методи виділення чистої культури мікроорганізмів, які засновані на ізоляції однієї мікробної клітини від маси мікроорганізмів і подальшим вирощуванням потомства цієї клітини на поживних середовищах, ізольованих від інших видів.

Для посіву частіше використовують агаризовані середовища в чашках Петрі. Цей метод запропонований відомим німецьким мікробіологом Кохом і названий методом пластинчастих (або чашкових) культур Коха. Основним завданням методу є розведення концентрації мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі з таким розрахунком, щоб при посіві його на поживне середовище вирости ізольовані колонії. Існують два основних методи розведення досліджуваного матеріалу:

- 1) на поверхні щільного поживного середовища «методом виснажуючого посіву»;
- 2) попереднє розведення матеріалу у фізіологічному розчині або

стерильній водопровідній воді в пробірках і висів готового розведення на щільне поживне середовище.

Метод виснажуючого посіву на поверхні щільного середовища використовується для виділення чистих культур аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів. Із цією метою для посіву беруть ряд чашок Петрі із щільним середовищем; у першу чашку наносять досліджуваний матеріал і розподіляють його по поверхні шпателем Дригальського або бактеріологічною петлею, рухаючи ними зигзагоподібними рухами зверху у низ. Потім, не стерилізуючи шпатель (або петлю), роблять посів послідовно на поверхню середовища в інших чашках. Кількість матеріалу, внесеного в середовище, при цьому послідовно убуває (виснажуючий посів).

Метод попереднього розведення досліджуваного матеріалу в стерильній водопровідній воді (або фізіологічному розчині) використовується для виділення чистих культур мікроорганізмів, як аеробних, так й анаеробних. Готують розведення матеріалу в 10–100 разів і більше (залежно від передбачуваного рівня контамінації мікроорганізмами) та роблять посів розведень, користуючись поверхневим або глибинним методом.

Посів в рідке середовище можна проводити петлею або піпеткою (пастерівською або градуйованою). Обидві пробірки тримають в нахиленому стані, щоб не намочити ватні пробки. Петлю з мікробним матеріалом занурюють безпосередньо в стерильне середовище та ополіскують. При внесенні клітин, узятих петлею із щільного середовища, матеріал розтирають по стінці пробірки у верхнього краю рідкого середовища, увесь час змиваючи його середовищем. В пробірки з м'ясо-пептонним агаром посів бажано проводити уколом.

Якщо розведення досліджуваного матеріалу виконано правильно, на поверхні середовища або в його товщі (залежно від методу посіву) утворюються ізольовані колонії мікроорганізмів, видимі неозброєним оком. Кожна колонія складається із клітин одного виду, однак для виділення чистої культури необхідно пересіяти колонію на окреме середовище, тобто ізолювати її від

мікроорганізмів інших видів.

Методика пересіву наступна:

1. В ліву руку беруть дві пробірки – одну із стерильним середовищем, іншу – з культурою та тримають в нахиленому положенні. В правій руці великим та вказівним пальцем тримають бактеріальну петлю та стерилізують над полум'ям пальника.

2. Виймають ватні пробки з обох пробірок, притискають їх до долоні мізинцем та безіменним пальцем правої руки та обпалюють краї пробірок. Слідкують за тим, щоб пробки не торкались сторонніх предметів.

3. Петлю вводять в пробірку з мікробною культурою, яку пересіваємо. Обережно, не торкаючись стінок, відбирають краплю рідкої культури. Якщо роблять пересів з косою агару, то для охолодження петлі спочатку слідує доторкнутися до поверхні агару, вільної від мікроорганізмів, після чого беруть невелику кількість мікробної маси зі скошеного щільного середовища.

4. Вводять петлю з матеріалом в пробірку зі стерильним рідким середовищем, намагаючись не зачепити стінок пробірки. При посіві на скошені поживні середовища петлю з клітинами мікроорганізмів занурюють майже до дна, де накопичуються найбільша кількість конденсаційної води. Трохи торкаючись петлею поверхні щільного середовища, але не розрихлюючи його, проводять від дна в верх штрих.

5. Петлю виймають, обпалюють краї пробірки та внутрішні краї пробок, після чого пробірки закривають.

6. Петлю знову обпалюють в полум'ї пальника.

7. На пробірці роблять надпис: назва культури та дату посіву.

Завершальним етапом виділення чистої культури мікроорганізмів невідомого виду є перевірка її чистоти на ізольованому середовищі візуально (перегляд посіву неозброєним оком) і мікроскопією мазка. Видова назва чистих культур більшості мікроорганізмів установлюють шляхом вивчення морфологічних, культуральних і фізіологічних властивостей.

Для ідентифікації цвілевих грибів досить вивчити морфологічні й

культуральні властивості. По сукупності вивчених ознак визначають таксономічне положення (положення в систематиці) мікроорганізмів, користуючись спеціальними визначниками.

Морфологічні властивості досліджують при мікроскопії прижиттєвих або фіксованих пофарбованих препаратів. Морфологічна характеристика мікроорганізму повинна включати форму клітин, їх скупчення й розміри, рухливість, здатність до утворення спор, наявність включень. При описі морфології слід вказувати вік культури, склад середовища, умови культивування.

Культуральні властивості мікроорганізмів установлюють по особливостях росту на поживних середовищах. На рідких поживних середовищах відзначати характер розподілу культури – рівномірне, викликаючи помутніння середовища, придонне або поверхневе, що обумовлено відношенням мікроорганізмів до кисню повітря

Мутність середовища може бути пластівчастою, однорідною.

Плівка – тонкою, щільною й пухкою, гладкою, зморшкуватою або складчастою.

Осад – бідним або рясним (кількість); щільним, пухким, слизуватим (консистенція).

На щільних поживних середовищах досліджують характер колоній. Оскільки колонія утвориться в результаті розмноження однієї клітки, та її будова залежить від особливостей розподілу клітин даного виду мікроорганізмів. Найбільше типово видові ознаки виражені у поверхневих колоній:

- форму, профіль, блиск і колір визначають візуально;
- край і структуру - при малому збільшенні мікроскопа;
- консистенцію (м'яка, слизувата, тягуча або тендітна) визначають дотиком до її поверхні петлею;
- розміри – звичайною лінійкою або окулярним мікрометром при малому збільшенні мікроскопа (колонії крапкові – менш 1 мм у діаметрі, дрібні – 1–2,

великі – більше 4 мм).

Фізіологічні властивості мікроорганізмів обумовлені ферментативною активністю й, отже, виражають особливості обміну речовин клітини. Це важлива диференціальна ознака, що використовується при ідентифікації бактеріальних і дріжджових видів.

Розповсюдженим методом вивчення фізіологічних властивостей мікроорганізмів є вирощування їх на диференційно-діагностичних середовищах, що дозволяє визначити біохімічну активність мікроорганізмів відносно речовин, уведених у середовище.

Хід роботи:

Робота виконується у *два етапи*. На *першому етапі* (перше заняття) студенти використовують харчові продукти, що мають один або кілька пороків мікробіологічного походження для виділення чистої культури й візуального вивчення.

1. Виділення чистої культури мікроорганізмів

Варто приготувати препарат «роздавлена крапля» для дріжджових і мікроскопічних грибів й «фіксований мазок для бактерій». Провести мікроскопіювання, виконати мікрографії й описати морфологічні ознаки препаратів: форми клітин, їх сполучення й розміри, здатність до утворення спор, форму спороносців.

По закінченню вивчення необхідно класифікувати виявлені мікроорганізми за їх приналежність – мікоміцети, дріжджі, бактерії. Далі виконуються операції по виділенню чистої культури мікроорганізмів методом Дригальського:

1. Взяти кожному студентові для посіву по дві чашки Петрі з м'ясо-пептоним агаром (для бактерій) або суслон-агаром (для дріжджів і мікоміцетів).

2. Підписати їх, вказавши дату, номер чашки, ініціали, поставити на стіл кришками догори.

3. За допомогою профламованої бактеріологічної петлі взяти невелику кількість досліджуваного матеріалу й внести в пробірку з 5 мл стерильної води

й добре перемішати.

4. Одну краплю такої суспензії за допомогою петлі або стерильної піпетки нанести на поверхню агару першої чашки. Стерильним шпателем Дригальського акуратно й ретельно розподілити по всій поверхні середовища. Цим же шпателем (не фламбуючи його) проводять по поверхні другої, а при необхідності третьої чашки. По закінченню посіву шпатель кладуть у дезінфікуючий розчин.

5. Чашки перевертають нагору дном, щоб конденсаційна вода, що накопичується, при застиганні середовища не стікала із кришки й не розмивала колонії. Поставити підготовлені посіви в термостат, чашки із МПА при температурі 37° С, із сулом-агаром при – 32° С.

2. Підрахунок кількості колоній

Другий етап роботи здійснюється на наступному занятті й складається з підрахунку кількості колоній, що вирости на чашках Петрі, опису їх культуральних ознак, мікроскопічного контролю чистоти культури в колоніях; ізоляції чистої культури на скошений агар у пробірку. Для цього виконують дії в наступній послідовності.

1. Візуально, не відкриваючи кришки чашки Петрі, описати культуральні ознаки колоній мікроорганізмів переважного типу на щільних середовищах (МПА, СА), заповнюють таблицю.

2. Провести мікроскопіювання колонії.

Для цього з невеликої частини колонії приготувати фіксований мазок й пофарбувати його фуксином. Мікроскопіювати із використанням імерсійного об'єктива. Наявність однорідних клітин свідчить про чистоту культури. Виконати мікрографію.

3. Пересіяти культуру вивченої колонії на скошений агар у пробірку. Дотримуючи умови стерильності, відібрати бактеріологічною петлею частину мікробної біомаси й посіяти її штрихом на поверхню скошеного агару. Операції по пересіванню бажано виконувати вдвох: один відкриває кришку чашки Петрі; другий у цей час виймає пробку, відбирає петлею матеріал і розподіляє його

штрихом по поверхні середовища й закриває пробкою пробірку.

Завдання до теми

1. Підготовка посуду

- а). Який посуд було підготовлено.
- б). Яким способом стерилізувався посуд та який час.

2. Підготовка поживного середовища

а). Яке поживне середовище було підготовлене (назва та склад) і в якій кількості.

- б). В який посуд було розлито.

3. Засів середовища культурою мікроорганізмів

- а). Яку культуру мікроорганізмів було використано.
- б). Яким способом відбувся посів.

4. Культивування

- а). Описати умови культивування.
- б). Час культивування

5 Результати експерименту занести в таблицю:

Найменування об'єкта	
Органолептичні показники продукту	
Колір	
Запах	
Консистенція	
Характеристики мікробіологічного пороку	
Зовнішній вигляд	
Колір	
Положення в середовищі (поверхнєве або глибинне)	
Форма колонії	
Розмір колонії	
Профіль	
Блиск	
Колір	
Використовуючи мале збільшення мікроскопа відзначити для колонії	
Форму краю	
Структуру	
Консистенція	

Контрольні питання:

1. Що варто розуміти під терміном «чиста культура», «клон»?
2. Укажіть призначення ЧК.
3. На яких прийомах засновані методи виділення ЧК?
4. Послідовність операцій методу Дригальського по виділенню ЧК.
5. Чим відрізняються методи виділення ЧК?
6. У чому полягає завершальний етап виділення ЧК?
7. Які ознаки встановлюють при ідентифікації ЧК?

Література: [2, с. 92–94; 3, с. 87–89; 5, с. 74–76; 7, с. 94–95; 8, с. 67, 118.]

Лабораторна робота № 8

Тема. Контроль повітря виробничих приміщень біотехнологічних виробництв

Мета: ознайомитися з методами контролю чистоти повітря на біотехнологічних підприємствах.

Матеріали, реактиви й устаткування: термостат, чашки Петрі, м'ясопептоний, дріжджовий агар або сусло-агар, лупа.

Навчальні елементи: спороутворюючі бацили, конідії грибів, актиноміцети, мікроби-контаміанти.

Короткі теоретичні відомості

У виробничих умовах джерелами мікробів-контаміантів можуть бути ґрунт, вода, повітря, люди. Із ґрунту в сферу біотехнологічних процесів потрапляють спороутворюючі бацили, конідії грибів, актиноміцети; ці ж мікроорганізми з пилом можуть потрапити в повітря, за посередництвом якого вони здатні проникнути в середовище вирощування біооб'єкту або в кінцевий продукт виробництва

Якісний склад і розміри часток у повітряному пилу коливаються в широких межах. У виробничих приміщеннях це залежить від конструкційних особливостей будинку, троянди вітрів, географічної зони розташування міста й підприємства, наявності або відсутності потоків автомобільного й іншого

транспорту, кількості безпосередньо зайнятих у технологічному процесі людей, характеру й локалізації складських приміщень і т. ін.

Пил, що утворюється або/і крапельки вологи в повітрі, як правило, містять на своїй поверхні шар адсорбованого повітря й більшу або меншу кількість мікроорганізмів. Газова оболонка охороняє частки від змочування. Такі частки являють собою дисперсну фазу аерозолу, стійкість якої залежить від розмірів (величини) часток, їх електричного заряду й поверхневої енергії.

Необхідно пам'ятати, що у випадку знаходження на частках аерозолу мікробних клітин, те їх негативний електричний заряд буде привносити свою частку в загальний заряд частки. Спираючись лише на величину аерозолу, що містить мікроорганізми, можна виділити три фази його: крупно ядерну (діаметр часток більше 100 мкм), дрібноядерну (діаметр часток менш 100 мкм) і фазу бактеріального пилу (діаметр часток від 1 мкм до 100 мкм).

Частки крупноядерної фази протягом декількох секунд осідають із повітря, тоді як частки двох інших фаз можуть довгостроково перебувати в повітрі, утворюючи стійку колоїдну систему.

Бактеріальний пил може формуватися з перших двох фаз після їх висихання й повторного потрапляння в повітря. У розряд часток з діаметром від 0,001 мкм до 1 мкм підпадають віруси й деякі бактерії. Аерозолі можуть бути шкідливими й для людини не тільки через мікроби, що перебувають на частках пилу або крапельках рідини, але й самі по собі внаслідок проникнення в альвеоли дихальної системи з наступним розладом її функцій.

У такому розумінні шкідливими є наступні аерозольні частки: азбесту, алебастру, абразивного порошку, графіту, гіпсу, діоксиду титану, дорожнього пилу, вапна, каоліну, корунду, карбіду кремнію, мармуру, оксиду олова, скловолокна й ін. В альвеоли проникають частки розміром менш 3 мкм при швидкості потоку вдихуваного повітря вже близько 1 см/с.

Повітря виробничих приміщень може стати джерелом мікробного забруднення сировини, полу фабрикатів та готових продуктів. Це може привести до погіршення їх якості, зниженню нормативних строків реалізації, а

також викликати різні захворювання людини.

Хід роботи

Для визначення кількості мікроорганізмів в повітрі використовують різноманітні методи. Одним з них є седиментаційний метод або метод осадження, який дуже простий і не вимагає спеціальної апаратури. Він заснований на осадженні пилу та крапель разом з мікроорганізмами на поверхню поживного середовища в відкритих чашках Петрі.

Для кожного визначення готують по 2 чашки з 10–15 мл м'ясопептонного, дріжджового агару або сусло-агару (рН = 7,2). Чашки переносять в приміщення та поміщають на розгорнутий папір, в якому вони стерилізувалися. Не перегортаючи, здвигають кришки на самий край чашки так, щоб вся поверхня агаризованого середовища була відкрита повністю.

Чашки залишають відкритими 5, 10 або 15 хвилин (час експозиції) в залежності від забруднення приміщення. Потім їх закривають кришками, перегортають уверх дном і поміщають в термостат. Чашки м'ясопептонним і дріжджовим агаром витримують 24 год при температурі 37° С, з сусло-агаром – 48 год при 30° С. Підрахунок колоній здійснюють візуально за допомогою лупи. Для розрахунку користуються формулою, запропонованою В.Л.Омелянським, згідно якої на поверхні чашки в 100 см² осаджується протягом 5 хвилин стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 10 л повітря. Кількість мікроорганізмів в 1 м³ повітря:

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100}{b \cdot T}$$

де a – число колоній які вирости в чашках Петрі (середнє з двох); b – площа чашки Петрі, см²; T – час експозиції, хв.; 100 – перерахунок площі чашки на 100 см²; 5 – експозиція чашки за Омелянським, хв.; 100 – перерахунок на 1 м³.

Завдання до теми

1. Підготовка посуду

- а). Який посуд було підготовлено;
- б). Яким способом стерилізувався посуд та який час;

2. Підготовка поживного середовища

а). Яке поживне середовище було підготовлене (назва та склад) і в якій кількості;

б). В який посуд було розлито;

3. Заповнити таблицю:

Визначення забрудненості повітря	
Кількість колоній	
Форма і вид колоній	
Кількість мікроорганізмів в повітрі	

Контрольні питання

1. Чому необхідно слідкувати за чистотою повітря в виробничих приміщеннях?

2. Якими методами можливо здійснити стерилізацію повітря в виробничих приміщеннях, в виробничому процесі.

3. За якою формулою розраховують кількість мікроорганізмів в повітрі?

Література: [4, с. 263–265; 6, с. 215–216; 8, с. 97, 107; 9, с. 154–156.]

Лабораторна робота № 9

Тема. Контроль якості води на біотехнологічних підприємствах

Мета: ознайомитися з методикою контролю якості води, яка використовується на підприємствах біотехнологічного та харчового профілів.

Матеріали, реактиви й устаткування: дослідна вода, чашки Петрі середовища МПА та Ендо, колби, піпетки, термостат, центрифуга.

Навчальні елементи: колі-титр, колі-індекс, аспорогенні палички.

Короткі теоретичні відомості

Вода, яка використовується на підприємствах біотехнологічної та харчової промисловості, повинна відповідати вимогам, діючого ДСТУ. Один раз у квартал при користуванні міським водопроводом й один раз на місяць при

наявності власних джерел водопостачання у воді визначають: загальну кількість бактерій, кількість бактерій групи кишкової палички й наявність патогенних мікроорганізмів (збудників черевного тифу, холери й дизентерії) за епідемічними показниками. Останній аналіз виконується лабораторіями санітарної інспекції.

Відбір проб. Посуд (пляшки по 0,25; 0,5 й 1 л) ретельно миють, закривають ватно-марлевими пробками, накривають паперовими ковпачками, зав'язують у горловини й стерилізують в автоклаві при 120° С на протязі 30 хв.

Для проб хлорованої води в пляшки перед стерилізацією вносять 2 мл 1,5 % розчину тіосульфату натрію. У посуд, стерилізований сухим жаром, вносять перед відбором проби 2 мл тіосульфату натрію, строго дотримуючи правила асептики.

Кран або край спускної труби обпалюють паяльною лампою або кільцевим запаленим ватяним тампоном, вимоченим спиртом. Відкривають кран і протягом 10–15 хв воду спускають, після чого роблять відбір проби.

Пляшку розв'язують, виймають пробку разом з паперовим ковпачком і набирають воду безпосередньо в підготовлений посуд, намагаючись не замочити ватяну пробку. Закривають пляшку пробкою над вогнем й зав'язують. З відкритих водойм проби беруть на визначеній глибині за допомогою батометра, що представляє собою металічний каркас, усередині якого встановлюється стерильна скляна пляшка з металевою пробкою й прив'язаної до неї мотузкою.

Батометр опускають у воду та на необхідній глибині, потягнувши за мотузку. Після заповнення склянки мотузку опускають та пробка автоматично захлопується. Піднявши барометр, металічну пробку заміняють ватною.

На пляшках з пробами води роблять надпис, в якому вказують назву та місцезнаходження джерела, дату та час відбору проби, метеорологічні умови (температура повітря, опади), мету дослідження, посаду та підпис особи, яка відбирала проби.

Вода підлягає аналізу не пізніше ніж 2 год від часу відбору проби. перевозити проби води необхідно при температурі не вище 5° С. Норми змісту мікроорганізмів у воді. Санітарно-гігієнічну оцінку якості води роблять на підставі показників, які виражають кількістю кишкових паличок в 1000 мл води (колі-індекс) або найменшим обсягом, що містить одну кишкову паличку, й вираженим у мілілітрах (колі-титр):

$$\text{Колі-титр} = 1000 / \text{Колі-індекс};$$

$$\text{Колі-індекс} = 1000 / \text{Колі-титр}$$

По діючому ДСТ для питної води, що пройшла очищення, титр кишкової палички повинен бути не нижче 300, коли-індекс – не більше 3; загальна кількість бактерій в 1 мол води – не більше 100.

Для інших джерел води норми не встановлені, але прийнято вважати, що:

а) артезіанська вода повинна містити не більше 100 бактерій в 1 мл та мати коли-титр не менше 500 (2–3 кишкові палички 1 л);

б) води колодязів і джерел можуть містити не більше 100 бактерій в 1 мол і мати коли-титр до 250–200 (4–5 кишкових паличок в 1 л);

в) вода відкритих водойм (ставків, рік, водоймищ, озер) може застосовуватися в біотехнологічних виробництвах тільки після очищення. Вода не повинна містити патогенних мікроорганізмів.

До бактерій групи кишкової палички відносяться мікроорганізми, які характеризуються загальними морфологічними й біохімічними властивостями, що живуть як у кишечнику людини, так і існуючі, як сапрофіти, в зовнішнім середовищі.

У групу кишкової палички входять три роди, що відносяться до сімейства *Enterobacteriaceae*:

– рід *Escherichia* (*E. coli*, *E. coli* var. *coliforme*, *E. coli* var. *aurescens*);

– рід *Citrobacter* (*C. freundii*, *C. freundii* var. *parafrenes*, *C. freundii* var. *intermedium*);

– рід *Enterobacter* (*E. aerogenes*, *E. aerogenes* var. *aerogenoides*, *E. cloacae*, *E. alginolyticus*).

Два останніх роди, на відміну від роду *Escherichia*, мають обмежене санітарне значення й не розцінюються як показники свіжого, безсумнівно фекального, забруднення.

При оцінці якості питної води по діючому ДСТУ враховують кишкові палички, які зброджують глюкозу з утворенням кислоти та газу при 35–37° С на протязі 24 год. Це короткі грам негативні аспорогенні палички, що ростуть на фуксин-сульфітному агарі (середовище Ендо) з утворенням червоних із металічним блиском, темно-червоних й рожевих з темним центром, а також прозорих незабарвлених колоній.

Розмір бактерії 0,5 · 1–2 мкм, більшість рухливі, які ростуть в широкому діапазоні температур (15–55° С), мають оптимум близько 37° С, гинуть при 60° С на протязі 15 хв, аероби або факультативні анаероби. На МПА через добу утворюють прозорі із сірувато-блакитним відливом колонії, з розпливчастими або хвилястими краями. При рості на рідких поживних середовищах дають сильне помутніння й сіруватий осад, плівки не утворюють. Желатину не розріджують.

Хід роботи

Визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл води. Стерильними піпетками відбирають по 1 мл досліджуваної води й її розведення (1:10) і засівають по 2 чашки Петрі.

Чисту воду (водопровідну, артезіанську) можна висівати без розведення або після попереднього центрифугування: 15–20 мл води центрифугують при частоті обертання 1500 об /хв протягом 10–15 хв, зливають верхній шар води й залишають у пробірці 5 мл, з яких після перемішування переносять у чашки Петрі по 0,1–0,2–0,3 й 0,5 мл. Забруднені зразки води висівають по 1 мл з десятикратних розведень (1:102 –1:103; 1:103–1:104). З кожної проби готують не менш двох розведень. Розведення готують таким чином, щоб після проростання в чашці було не менш 30 і не більше 300 колоній.

Підраховують кількість клітин мікроорганізмів у певному розведенні (або обсязі), потім перераховують на 1 мл води. При наявності в 1 мл від 0 до 100

колонії мікроорганізмів вода вважається чистою, від 100 до 1000 колоній – сумнівною, понад 1000 – непридатною. Для визначення клітин кишкової палички проводять посів води на щільне середовище Ендо, з подальшим витриманням чашок при температурі 37° С на протязі 24 год.

Завдання до теми

1. Підготовка посуду

- а). Який посуд було підготовлено.
- б). Яким способом стерилізувався посуд та який час.

2. Підготовка поживного середовища

а). Яке поживне середовище було підготовлене (назва та склад) і в якій кількості.

б). В який посуд було розлито.

3. Заповнити таблицю:

Визначення забрудненості води	
Кількість колоній на середовищі №1	
Кількість колоній на середовищі №2	
Форма і вид колоній	

Контрольні питання

1. Що таке колі-індекс?
2. Що таке колі-титр?
3. Які вимоги пред'являють до якості води, яка використовується в технологічному процесі?

Література: [4, с. 305–307; 8, с. 91, 245; 11, с. 204–205; 15, с. 222–224.]

Лабораторна робота № 10

Тема. Санітарно-гігієнічний контроль на біотехнологічних підприємствах

Мета: ознайомитися з санітарно-гігієнічним контролем на біотехнологічних підприємствах.

Матеріали, реактиви й устаткування: термостат, пробірки, вода, ватні тампони, середовище МПА, середовище Кесслер, середовище Ендо, бактеріологічні петлі, мікроскоп.

Навчальні елементи: термостатування, центрифугат.

Короткі теоретичні відомості

Контроль апаратів й устаткування проводять безпосередньо після мийки, дезінфекції й пропарювання перед початком роботи шляхом висіву відібраних змивів для визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл, а якщо буде потреба – присутності слизеутворюючих бактерій. На ряді біотехнологічних підприємств (пивоварних, молочних, хлібопекарських, дріжджових) змиви одночасно досліджують на наявність бактерій групи кишкової палички.

Готують стерильні ватяні або марлеві тампони, пробірки з 10 мл стерильної води (або фізіологічного розчину) і стерильні пінцети. Тампони можна закріпити на дерев'яних стрижнях, кожний окремо опустити в пробірки з 10 мл води й простирилізувати при 0,1 МПа протягом 20–30 хв.

Змиви з великого устаткування й апаратів беруть за допомогою нержавіючих металевих трафаретів з вирізаною серединою (площа вирізу 10, 25 або 100 см²). Перед узяттям проби трафарет змочують спиртом, обпалюють і накладають на досліджувану поверхню.

Обмежену площу промивають змоченим тампоном, після чого тампон опускають у ту ж пробірку, занурюють у воду, що залишилася, або фізіологічний розчин і добре перемішують. Висівають 1 мл змиву на МПА. Визначають загальну кількість мікроорганізмів після термостатування при 37° С на протязі 48 год. Змив можна використати для визначення слизеутворюючих бактерій (лейконостока) висівом на спеціальні середовища.

Залишок змивної рідини разом з тампоном засівають у пробірки з поплавцями й 5 мл середовища Кесслер, витримують у термостаті при 43° С на протязі 18–24 год. Застосовуючи індикатор, аналіз реєструють через 12 год при 43° С. У змивах стерильного устаткування й апаратів мікроорганізми відсутні.

У добре вимитих апаратах загальна кількість мікроорганізмів і титр кишкової палички не повинні перевищувати їх змісту в чистій воді, яка надходить на мийку. Кількість слизеутворюючих бактерій не повинно бути більше 5 в 1 мл.

Внутрішня поверхня трубопроводів, рукавів, шлангів, деяких апаратів недоступна для взятті змивів за допомогою трафарету. У цьому випадку перевірку на наявність мікроорганізмів і колі-титр ведуть шляхом мікроскопіювання препаратів і посівом останньої промивної води.

В стерильний посуд відбирають зразки води при виході з досліджуваних об'єктів. 10 мл промивної води центрифугують при 1500–2000 об/хв протягом 10 хв. Центрифугат зливають, осад мікроскопіюють. В 10 полях зору повинно бути не більше 5–6 клітин. Наявність мікроорганізмів у кожному полі зору вказує на незадовільну мийку.

Посів на загальну кількість мікроорганізмів роблять на МПА або сусло-агар. Колі-титр визначають методом мембранних фільтрів або бродильних проб. Загальна кількість мікроорганізмів і колі-титр промивної води не повинні відрізнятися від показників води, яка використовується в виробництві.

Контроль посуду та інвентарю. Із кожної мийної машини відбирають 5–10 вимитих пляшок н закривають стерильними ватяними пробками.

У лабораторії їх ретельно обполіскують 100 мл стерильної води (або фізіологічного розчину), по черзі переливаючи з однієї пляшки в іншу й змочуючи всю її внутрішню поверхню.

З останньої пляшки роблять висів для визначення загальної кількості мікроорганізмів, слизеутворюючих бактерій і колі-титру. Загальна кількість мікроорганізмів у перерахуванні на одну пляшку повинна бути не більше 300, в 1 кг промивної води – не більше ніж в воді яка застосовувалась для ополіскування пляшок; слизеутворюючі бактерії повинні бути відсутніми; колі-титр повинен бути не менш 100.

Для оцінки мийки цехового інвентарю проби відбирають у той момент, коли інвентар підготовлений до роботи. Із дрібного інвентарю (мішалки, пробники, термометри, ножі, шприци і т. п) мазки беруть стерильним тампоном

з усією поверхні предмета й досліджують на загальну кількість визначення наявності кишкової палички.

Чистоту стін й полу виробничих приміщень контролюють шляхом мікроскопіювання проб, узятих у такий спосіб: зскрібають частину забрудненої поверхні, зіскрібок поміщають у пробірку зі стерильною водою, добре збовтують, готують препарат і переглядають під мікроскопом без фарбування або після фарбування мазків метиленовим синім.

Для кількісного обліку мікроорганізмів користуються трафаретом і стерильним змоченим ватяним тампоном з наступним висівом на щільні середовища в чашки Петрі.

Чистоту рук перевіряють перед початком виробничого процесу у робітників, що мають безпосередній контакт із продукцією або чистим устаткуванням. Контроль роблять без попереднього попередження.

Закріплений па дерев'яному стрижні стерильний тампон змочують стерильною водою (або фізіологічним розчином) і протирають їм долоні, тильну поверхню, під нігтями та між пальцями обох рук. Тампон занурюють у ту ж пробірку, в якій відбувалося змочування, добре збовтують, відбирають 1 мл і готують розведення (1:10 й 1 : 100).

Для визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл змиву роблять посів розведення на МПА з наступним термостатування при 37° С на протязі 48 год. Залишок змиву разом з тампоном висівають у пробірки із 5 мл середовища Кесслер і вирощують 24 год при температурі 43° С. Далі визначають наявність кишкових паличок методом бродильних проб.

Можна застосувати й такий метод: у складені разом кисті рук наливають 100 мл стерильної воли так щоб вода добре промивала пальці. Стерильним тампоном протирають долоні й нігті. Воду збирають у стерильну склянку й туди ж кидають тампон.

Змивну воду перемішують і роблять аналогічні посіви. Чистоту рук оцінюють за кількістю мікроорганізмів в 1 мл змиву при відсутності кишкових паличок:

Кількість мікроорганізмів в 1 мл змиву з рук	Оцінка чистоти
1000	відмінно
1000–5000	добре
5000–10000	задовільно
Більше 10000	погано

Періодично перевіряють обробку рук хлоруванням. Для цього проводять якісну реакцію: ватяний тампон змочують йод крохмальним розчином (суміш рівних кількостей 6 % розчину КJ й 4 % розчину розчинного крохмалю) і протирають окремі ділянки рук. В присутності іонів хлору тампон і протерта ділянка рук офарблюються в синьо-бурий колір.

Халати, куртки, фартухи, рукавички із тканини періодично досліджують на присутність кишкових паличок посівом 1 мл змивної води в середовище Кесслер. Кишкові палички на чистому спецодязі відсутні.

Хід роботи

1. Провести аналіз лабораторного обладнання.
2. Провести аналіз підлоги,
3. Провести аналіз стін.
4. Провести аналіз стерильного посуду.
5. Зробити посіви з поверхні рук.

Завдання до теми

1. Підготовка посуду
 - а). Який посуд було підготовлено.
 - б). Яким способом стерилізувався посуд та який час.
- 2 Підготовка поживного середовища
 - а). Яке поживне середовище було підготовлене (назва та склад) і в якій кількості.
 - б). В який посуд було розлито.
- 3 Взяття проб
 - а). Проба з приладів.
 - б). Проба зі стін та полу.

в). Проба з рук.

4 Культивування

а). Описати умови культивування.

б). Час культивування

5 Опис результатів експерименту:

Проба з приладів	
Проба зі стін та підлоги	
Проба з рук	

Контрольні питання

1. Яким чином проводиться контроль апаратів та приладів?
2. Яким чином проводиться контроль трубопроводів?
3. Яким чином проводиться контроль чистоти рук працівників?

Література: [1, с. 412–414; 3, с. 215–217; 4, с. 578–579; 6, с. 312–315; 8, с. 262, 398; 10, с. 334–335; 11, с. 322–323; 15, с. 498–501.]

КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ

Навчальні досягнення студентів із дисципліни «Біохімія» оцінюються за модульно-рейтинговою системою, в основу якої покладено принцип поопераційної звітності, обов'язковості модульного контролю, накопичувальної системи оцінювання рівня знань, умінь та навичок; розширення кількості підсумкових балів до 100.

«Відмінно»

Ставиться за повні та міцні знання матеріалу в заданому обсязі, вміння вільно виконувати лабораторні роботи, передбачені навчальною програмою; за знання основної та додаткової літератури; за вияв креативності у розумінні і творчому використанні набутих знань та умінь.

«Добре»

Ставиться за вияв студентом повних, систематичних знань із дисципліни, успішне виконання лабораторних робіт, засвоєння основної та додаткової літератури, здатність до самостійного поповнення та оновлення знань.

Але у відповіді студента наявні незначні помилки.

«Задовільно»

Ставиться за вияв знання основного навчального матеріалу в обсязі, достатньому для подальшого навчання і майбутньої фахової діяльності, поверхову обізнаність з основною і додатковою літературою, передбаченою навчальною програмою; можливі суттєві помилки у передбаченою навчальною програмою; можливі суттєві помилки у виконанні лабораторних завдань, але студент спроможний усунути їх із допомогою викладача.

«Незадовільно»

Виставляється студентові, відповідь якого під час відтворення основного програмового матеріалу поверхова, фрагментарна, що зумовлюється початковими уявленнями про предмет вивчення. Таким чином, оцінка «незадовільно» ставиться студентові, який неспроможний до навчання чи

виконання фахової діяльності після закінчення ВНЗ без повторного навчання за програмою відповідної дисципліни

Порядок переведення рейтингових показників успішності у європейські оцінки ECTS

Підсумкова кількість балів	Оцінка за національною шкалою для заліку	Оцінка за шкалою ECTS
1–34	«незадовільно» (з обов'язковим повторним курсом)	F
35–59	«незадовільно» (з можливістю повторного складання)	FX
60–63	«задовільно»	E
64–73		D
74–81	«добре»	C
82–89		B
90–100	«відмінно»	A

Кожний модуль включає бали за поточну роботу студента на лабораторних роботах, практичних заняттях, виконання самостійної роботи, індивідуальну роботу, модульну контрольну роботу.

Виконання модульних контрольних робіт здійснюється в режимі комп'ютерної діагностики або з використанням роздрукованих завдань.

Реферативні дослідження, які виконує студент за визначеною тематикою, обговорюються та захищаються на індивідуальних заняттях. Модульний контроль знань студентів здійснюється після завершення вивчення навчального матеріалу модуля.

Кількість балів за роботу з теоретичним матеріалом, на лабораторних роботах, під час виконання самостійної та індивідуальної навчально-дослідної роботи залежить від дотримання таких вимог: своєчасність виконання навчальних завдань; повний обсяг їх виконання; якість виконання навчальних завдань; самостійність виконання; творчий підхід у виконанні завдань; ініціативність у навчальній діяльності.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Основна

1. Биотехнология / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беета, Дж. Джонса. Пер. с англ. – Москва : Мир, 1988. – 480 с.
2. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. И. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Москва : Высш. шк., 1987. – Кн. 1. – 159 с.
3. Биотехнология / Под ред. А. А. Баева. – Москва : Наука, 1984. – 309 с.
4. Елинов Н. П. Основы биотехнологии. Для студ. ин-тов, аспирантов и практич. работников / Н. П. Елинов – С.-Пб.: Наука, 1995. – 600 с.
5. Егорова Т. А. Основы биотехнологии: Учеб. пособие для высш. пед. учеб. завед. / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина // Под ред. Т. А. Егорова. – Москва : издат. центр «Академия», 2003. – 208 с.
6. Рогов И. А. Пищевая биотехнология: В 4 кн. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии. / И. А. Рогов, Л. В. Антипова, Г. П. Шуваева – Москва : Колос, 2004. – 440 с.
7. Сазыкин Ю. О. Биотехнология: Учебное пособие для студ. высш. учеб. Заведений / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева / Под ред. А. В. Катлинского. – Москва : Издательский центр «Академия», 2006. – 256 с.
8. Галяс В. Л. Біохімічний і біотехнологічний словник / В. Л. Галяс, А. Г. Колотницький – Львів : Оріяна-Нова, 2006. – 468 с.

Додаткова

9. Альбер Сассон. Биотехнология: свершения и надежды. Пер. с англ. / Сассон Альбер – Москва : Мир, 1987. – 411 с.
10. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др. 2-е изд. перераб. и доп. – Москва : Высш. шк., 2003. – 469 с.
11. Герасименко В. Г. Биотехнология: Уч. пособие для слушателей системы повышения квалификации Госагропрома / В. Г. Герасименко – Київ : Вища шк., 1989. – 343 с.

12. Голубев В. Н. Пищевая биотехнология / В. Н. Голубев, И. Н. Жиганов– Москва : Дели принт, 2001. – 123 с.
13. Безбородов А. М. Основы биотехнологии микробных синтезов / А. М. Безбородов – Ростов на Дону : Знание, 1989. – 112 с.
14. Кислухина О. Биотехнологические основы переработки растительного сырья / О. Кислухина, И. Кюдулас – Каунас : Технология, 1997. – 182 с.
15. Імунологія: Підручник / Вершигора А. Ю., Є. У. Пастер, Колибко Д. В. та ін. / За ред. А. Ю. Вершигори, Є. У. Пастера, Д. В. Колибко. – Київ : Вища шк., 2005. – 599 с.

Методичні вказівки щодо лабораторних робіт з навчальної дисципліни
«Загальна біотехнологія» для студентів денної форми навчання за напрямом
6.051401 «Біотехнологія»

Укладачі: д.б.н., проф. В. В. Никифоров,
старш. викл. О. О. Никифорова

Відповідальний за випуск заст. зав. кафедри к.х.н., доц. О. В. Новохатько

Підп. до др. _____ 2017 р. Формат 60x84 1/16. Папір тип. Друк ризографія.
Ум. друк. арк. _____. Наклад _____ прим. Зам. № _____. Безкоштовно.

Видавничий відділ
Кременчуцького національного університету
імені Михайла Остроградського
вул. Першотравнева 20, м. Кременчук, 39600