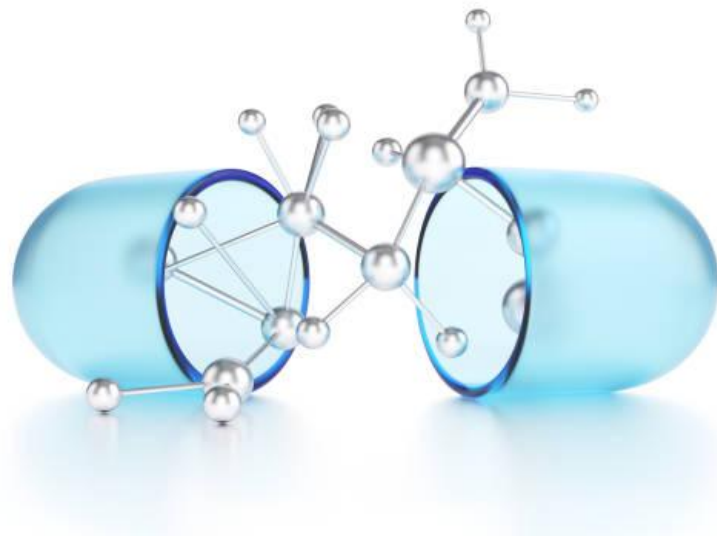


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького
Кафедра біотехнології та радіології**

ВСТУП ДО ФАХУ

**Методичні вказівки для лабораторних та
самостійних робіт
здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»**



Львів 2024

Вступ до фаху : методичні вказівки для лабораторних та самостійних робіт здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія ОП «Біотехнології та біоінженерія» / уклад. О. В. Штапенко, Н. П. Шемедюк, І. І. Двилюк. Львів : Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2024. 33°с.

Рецензент: Горчин С. В. – кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри екології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнології ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького.

Протокол № 13 від 10 грудня 2024 р.

Зміст

1.	Вступ. Загальні поняття біотехнології	4
2.	Історія розвитку та досягнення біотехнології	6
3.	Лабораторна робота №1. Принципи організації та особливості роботи у біотехнологічній лабораторії. Основні правила техніки безпеки при роботі у лабораторії.	10
4.	Лабораторна робота №2. Ознайомлення з різними видами біооб'єктів для біотехнологічних виробництв.	13
5.	Лабораторна робота №3. Ознайомлення з основними видами поживних середовищ та субстратів для культивування мікроорганізмів.	15
6.	Лабораторна робота №4. Методи стерилізації посуду та живильних середовищ.	16
7.	Лабораторна робота №5. Загальна характеристика біотехнологічного процесу. Елементи біотехнологічного процесу.	17
8.	Вибір об'єктів біотехнологічних виробництв. Основи селекційної роботи.	21
9.	Лабораторна робота №6. Методи одержання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів	22
10.	Лабораторна робота №7. Загальне ознайомлення з калюсною культур рослин	23
11.	Контрольні запитання	26
12.	Глосарій основних термінів	28
13.	Список використаної літератури	31

ВСТУП

Предметом вивчення дисципліни «Вступ до фаху» є ознайомлення здобувачів з обраним фахом біотехнолога, історією становлення та перспективами розвитку біотехнології, а також теоретичними основами та базовими закономірностями застосування методів традиційної та сучасної біотехнології в практичній діяльності.

Метою вивчення дисципліни «Вступ до фаху» є теоретична підготовка здобувачів вищої освіти, майбутніх фахівців – біотехнологів, формування у здобувачів уявлення про свою майбутню професійну діяльність та науковий світогляд щодо біотехнологічних процесів, методів створення та виробництва біотехнологічної продукції, а також можливостей практичного впровадження біотехнологічних процесів у різних галузях народного господарства, зокрема в харчовій промисловості, сільському господарстві, медицині, фармації, екології та ін.

Завданням дисципліни «Вступ до фаху» є ознайомлення з поняттями та термінами, які використовуються у біотехнології, фундаментальними дослідженнями та досягненнями в цій галузі, а також різноманітними видами біооб'єктів, що застосовуються для виробництва різноманітної біотехнологічної продукції.

Загальні поняття біотехнології

Існує багато визначень біотехнології як галузі.

Біотехнологія (βιοτεχνολογία від грецької *bios* – життя, *techne* – майстерність і *logos* – навчання) – це один із пріоритетних напрямів сучасної науки, головним завданням якої є використання клітин мікроорганізмів, рослин або тварин, а також окремих компонентів клітин для отримання продукції необхідної людству.

Біотехнологія - це сукупність технологій, що передбачають використання біологічних процесів і біологічних агентів для отримання високоефективних форм мікроорганізмів, культур клітин і тканин рослин та тварин із заданими властивостями. Вони спрямовані на забезпечення людства продуктами харчування, енергією, медичними препаратами, та ін. У біотехнології використовуються як загальні, так і специфічні методи.

Загальні методи біотехнології засновані на явищі ферментації – використанні у виробничих процесах ферментів мікроорганізмів. Саме на цьому явищі ґрунтується виробництво хліба, пива, вина, кисломолочних продуктів, оцту.

Продуктами діяльності мікроорганізмів є такі вироби, як кефір, ряжанка, йогурти, кумис. Без процесу ферментації неможливо, наприклад, виготовити сир.

У цій галузі використовують мікроскопічні гриби й бактерії. Це пекарські дріжджі (для виготовлення хліба), аспергіли (для виготовлення сирів), термофільні стрептококи та болгарська молочна паличка (для виготовлення йогуртів та інших кисломолочних продуктів), інші мікроорганізми. Але традиційні галузі застосування мікроорганізмів наразі розширюються. За

допомогою мікроорганізмів отримують низку лікарських препаратів (наприклад, препарати з групи стероїдів).

Особливо слід виділити методи клітинної та генної інженерії, які дозволяють створювати клітини зі заздалегідь відомими властивостями в експериментальних умовах. Ці методи лежать в основі сучасної біотехнології. Вони почали активно розвиватися із 60-х років XX століття, коли було встановлено роль ДНК у спадковості й розкрито механізми реалізації спадкової інформації.

Клітинна інженерія – це галузь біотехнології, яка розробляє й використовує технології культивування клітин і тканин поза організмом у штучних умовах. Крім того, у рамках клітинної інженерії розробляються та використовуються технології гібридизації клітин.

Одним із напрямів клітинної інженерії є клонування тварин і рослин. Наприклад, клонування рослин дозволяє дуже швидко розмножувати найбільш цінні особини, які відрізняються гарною врожайністю, підвищеною стійкістю до хвороб або іншими якостями. Це особливо важливо для вирощування дерев, оскільки значно підвищує швидкість їх розмноження.

Генетична інженерія – це галузь біотехнології, яка розробляє й використовує технології виділення генів з організмів і окремих клітин, їх видозмінення й уведення в інші клітини або організми.

Суть генетичної інженерії полягає в штучному створенні генів з потрібними властивостями та введенні їх у відповідну клітину. Перенесення гена здійснює вектор (рекомбінантна ДНК) – спеціальна молекула ДНК, сконструйована на основі ДНК вірусів або плазмід, яка містить потрібний ген і здатна транспортувати його до клітини та забезпечити його вбудовування в її генетичний апарат.

З'ясування ролі нуклеїнових кислот у передачі спадкової інформації, розшифрування генетичного коду, розкриття механізмів індукції та репресії генів, удосконалення технології культивування мікроорганізмів, клітин і тканин рослин та тварин дозволили розробити методи генетичної і клітинної інженерії, за допомогою яких можна штучно створювати нові форми високопродуктивних організмів. Саме генетична та клітинна інженерія визначили головні напрямки сучасної біотехнології.

Клітинна інженерія – це галузь біотехнології, яка розробляє й використовує технології культивування клітин і тканин поза організмом у штучних умовах. Крім того, в рамках клітинної інженерії розробляють і використовують технології гібридизації клітин.

Об'єктом дослідження клітинної інженерії є культури клітин (вищих тварин чи рослинних організмів), отримані культивуванням у різних середовищах окремо виділених із організмів клітин, чи мікроорганізми, отримані методом генної інженерії.

Метод клітинної інженерії дозволяє значно прискорити селекційний процес під час виведення нових сортів хлібних злаків та інших цінних сільськогосподарських культур, а також одержувати гібриди, які не можуть бути створені звичайним шляхом схрещування через бар'єр міжвидової несумісності. Великих успіхів досягнуто клітинною інженерією в області імунології.

Розроблено методи отримання особливих гібридних клітин, що виробляють

індивідуальні або моноклональні антитіла. Це дозволило створити високочутливі засоби діагностики низки важких захворювань людини, тварин та рослин.

Основними напрямками біотехнології є медичний (фармацевтичний, імунний); сільськогосподарський (ветеринарія, рослинництво); промисловий (харчова, легка, хімічна промисловість, енергетика); екологічний (очищення стічних вод, переробка відходів та ін.).

Історія розвитку і становлення біотехнології

Вченими виділяється такі основні періоди становлення біотехнології:

Перший період, як і у всіх інших наук – це **емпіричний** (від грец. «empeirikos» -дослідний) або доісторичний, який тривав до 1865 р. (6000 р до н.е. + 2000 р. н.е.).

З покоління в покоління народи використовували різні методи і способи виготовлення таких продуктів, які ми зараз відносимо до біотехнологічних:

- виготовлення хліба;
- виготовлення пива;
- виготовлення оцту;
- отримання медових алкогольних напоїв;
- перша дистиляція у виноробстві (12 ст.);
- виготовлення горілки з хлібних злаків (16 ст.);
- виготовлення шампанського (18 ст.);
- отримання кисломолочних продуктів;
- отримання квашених овочів;
- силосування кормів.

Другий період - **етіологічний або пастерівський** (від грец. «aitia»- причина) період другої половини XIX ст. – початку XX ст. (1856-1933 рр.).

Він пов'язаний з видатними дослідженнями великого французького вченого Луї Пастера (1822–1895) – засновника наукової мікробіології та ряду мікробіологічних дисциплін (промислової, медичної, хімічної, санітарної мікробіології). Л. Пастер розкрив мікробну природу бродіння, довів можливість життя в безкисневих умовах, створив наукові основи вакцинопрофілактики та вакцинотерапії, запропонував метод стерилізації, названий пастеризацією. Взаємодія науки і мікробіологічних досліджень наприкінці XIX – на початку XX століття зумовила революційне перетворення мікробіологічних виробництв.

Серед досягнень другого періоду слід виділити:

-1856 р. - Г. Мендель відкрив закони домінування ознак та ввів поняття одиниці спадковості у вигляді дискретних факторів, які передаються від батьків нащадкам, пізніше названих генами.

-1859 р. - роботи Луї Пастера:

- ✓ встановлення мікробної природи бродіння;
- ✓ доказ можливості життя у без кисневих умовах;
- ✓ виготовлення рідкого поживного середовища.

-1881р. - роботи Р. Коха: метод культивування бактерій на стерильних шматочках картоплі та на агаризованих середовищах внаслідок чого стало можливим отримання чистих культур з наступним цільовим використанням (бродіння, окислення).

-1883р. – І. Мечников розробив теорію клітинного імунітету.

-1892р. - Д. Івановський відкрив віруси.

У цей період активно розвивається виробництво пресованих дріжджів, ацетону, бутанолу, лимонної та молочної кислот.

Термін «біотехнологія» був запропонований у 1917 році угорським інженером Карлом Ерекї для опису великомасштабного вирощування свиней з використанням в якості корму цукрового буряку. За визначенням К. Ерекї, "біотехнологія" – це «усі види робіт, коли з сировини за допомогою живих організмів виробляються ті, чи інші продукти». У 1961 році, коли шведський мікробіолог Карл Хеден запропонував нову назву журналу «Біотехнологія і біоінженерія» біотехнологію поєднали з дослідженнями у галузі «промислового виробництва товарів та послуг за участю живих організмів, біологічних систем і процесів».

Третій період - біотехнічний (1933-1972 рр.).

Усі прогресивні досягнення того часу знайшли своє застосування у біотехнології.

Значний поштовх у розвитку промислової біотехнології був пов'язаний з виробництвом антибіотиків у період Другої світової війни (1939-1945 рр.). У 1928 р. англійський мікробіолог О. Флемінг відкрив антибіотик пеніцилін.

-1933 р. – А. Клюйвер та А. Перкін запропонували основні технічні прийоми глибинного культивування пліснявих грибів та методи оцінки продуктів культивування (опублікували роботу «Методи вивчення обміну речовин у пліснявих грибів»). Розпочалося впровадження у біотехнологію великомасштабного герметичного обладнання, яке забезпечує стерильні умови культивування.

-1936 р. – конструйовано та впроваджено у практику біореактор (ферментер, апарат-культиватор).

-1939-1945 рр. – розвиток промислового обладнання для виробництва антибіотиків.

-1943 р. – виготовлення пеніциліну у промислових масштабах.

-1939 р. – А. Тізеліус – розробив теорію електрофорезу.

-1942 р. – М.Дельбрюк і Т. Андерсон вперше побачили віруси у електронному мікроскопі.

-1949 р. – Дж. Ледерберг відкрив процес кон'югації у *E.coli*.

-1950 р. – Ж. Моно розробив теоретичні основи безперервного керованого культивування мікробів.

Біотехнічний період характеризувався широким використанням аналітичних методів; широким застосуванням мікробного синтезу (отримання мікробного білка, бактеріальних полісахаридів); одержання чистих ферментів; промисловим використанням іммобілізованих ферментів та клітин.

Результати фундаментальних досліджень у галузі біохімії і молекулярної біології, створили передумови для керування елементарними механізмами життєдіяльності клітини, що стало потужним імпульсом для розвитку біотехнології.

-1950 р. – відкриття Чаргаффом нуклеотидного складу ДНК

-1953 р. – американський біолог Джеймс Уотсон та британський молекулярний біолог Френсіс Крик визначили структуру подвійної спіралі ДНК, що, у свою чергу, привело до нових відкриттів принципів роботи ДНК на молекулярному рівні.

-1959 р. – японські вчені відкрили плазмиди антибіотикостійкості (R-фактор) у дизентерійної бактерії.

-1960 р. – С. Очоа та А. Корнберг виділили білки-ферменти, які можуть «зшивати» нуклеотиди у полімерні ланцюги. Була виділена ДНК-полімераза з кишкової палички.

-1962р. – Х. Корана синтезував хімічним способом функціональний ген.

-1970р. – Виділили фермент рестриктазу.

У 1972 році американські науковці Герберт Бойер, Пол Берг і Стенлі Коен розробили рекомбінантну ДНК, яка поєднала ДНК людини та бактерії. Вчені винайшли спосіб перетворення бактерій у «фабрики» по виготовленню таких важливих для людини білків як інсулін та гормон росту.

Розпочався четвертий період – геннотехнічний (від грец. «genesis» - походження) (з 1972 р.) Він пов'язаний з удосконаленням аналітичних методів шляхом автоматичного (за допомогою приладів) визначення структури білків, амінокислотної послідовності білків, створення атласу білків у комп'ютерних системах, розробка експрес-методу хімічного аналізу ДНК, послідовності нуклеотидів.

Досягнення біотехнології у четвертому періоді:

- Розробка інтенсивних процесів (замість екстенсивних) з продуцентами антибіотиків, ферментів, амінокислот та вітамінів.
- Отримання суперпродуцентів.
- Створення різних продуктів на основі генно-інженерних технологій.
- Створення генетично модифікованих організмів (ГМО).

-1975 р. – Г.Келер і Ц. Мільштейн описали метод отримання моноклональних антитіл.

-1977 р. – М. Максам і У. Гілберт розробили метод аналізу первинної структури ДНК шляхом хімічної деградації.

-1982 р. – надійшов у продаж людський інсулін, отриманий від клітин E.coli, дозволено застосування рекомбінантних вакцин; розроблені генно-інженерні інтерферони, інтерлейкін-2, соматотропний гормон людини.

-1986 р. – К. Мюлліс розробив метод полімеразно ланцюгової реакції.

-1988 р. – розпочато широкомасштабне виробництво обладнання та діагностичних наборів для ПЛР.

-1997 р. – отримання клону тварини (вівця Доллі) з диференційованої соматичної клітини.

-1981-1982 рр. – Р. Пальмітер, Р. Брінстер, А. Спредлінг, Г. Рубін отримали трансгенну мишу. Отримано трансгенні екземпляри дрозофіли.

-1993 р. – Л. К. Ернст, Г. Брем, В. Прокоф'єв створили трансгенні вівці.

Біотехнологічні розробки вносять вагомий внесок у вирішення комплексних проблем у різних галузях народного господарства, охорони здоров'я, науки.

До першочергових завдань біотехнології належать:

- створення нових біологічно активних речовин та лікарських препаратів для медицини (інтерферонів, гормонів, моноклональних антитіл та ін.), які дозволяють здійснювати в охороні здоров'я ранню діагностику та лікування важких захворювань – серцево-судинних, злоякісних, спадкових, інфекційних, у тому числі вірусних;
- створення засобів захисту рослин від хвороб та шкідників (біоінсектициди, біогербіциди, біофунгіциди), бактеріальних добрив і регуляторів росту рослин;
- нових високопродуктивних та стійких до несприятливих факторів зовнішнього середовища сортів та гібридів сільськогосподарських рослин, які отримані методами генетичної та клітинної інженерії;
- вирощення клітинних рослинних культур – високоефективних продуцентів біологічно активних речовин (алкалоїдів, терпенів, різних пігментів, олій, запашних речовин);
- створення цінних кормових добавок і біологічно активних речовин (кормового білка, амінокислот, ферментів, вітамінів, ветеринарних препаратів та ін.) для підвищення продуктивності тваринництва; нових методів біоінженерії для ефективної профілактики, діагностики терапії основних хвороб сільськогосподарських тварин;
- освоєння технологій отримання господарсько цінних продуктів для використання у харчовій (виготовлення харчових домішок на основі мікробного синтезу: амінокислот, органічних кислот, вітамінів, підсилювачів смаку, підсолоджувачів за допомогою генноінженерних штамів *Escherichia coli*; ферментних препаратів, барвників для підвищення поживної цінності харчових продуктів; використання біомаси одноклітинних організмів в якості харчових домішок (білок одноклітинних організмів – БОО);
- впровадження глибокої та ефективної переробки сільськогосподарських, промислових та побутових відходів, використання стічних вод і газоповітряних викидів для отримання біогазу та високоякісних добрив (біогумусу).

Завдання :

1. Скласти схему «Напрями використання біотехнології»
2. Скласти схему «Дисципліни, які покладені в основу створення біотехнології»

Лабораторна робота №1

Принципи організації та особливості роботи у лабораторії. Основні правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії

Ознайомлення з мінімальний набором приладів, інструментів, лабораторного посуду та обладнання.

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У БІОТЕХНОЛОГІЧНОМУ ПРАКТИКУМІ

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

Завдання: Вивчити основні правила техніки безпеки при роботі в біотехнологічній лабораторії, вивчити функціональні призначення спеціальних видів лабораторного посуду, обладнання для проведення біотехнологічного дослідження.

Матеріали та обладнання: прилади загального та індивідуального користування, різний лабораторний посуд.

Загальні правила безпечної роботи в лабораторіях під час занять

1. Працювати в лабораторії необхідно в халаті, захищаючи одяг та шкіру від попадання реактивів та контамінації 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.
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 приступати 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).
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. Дуже леткі легкозаймисті 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 уважно, раціонально та правильно використовувати відведений для роботи час.

Після закінчення роботи слід прибрати своє робоче місце і помити посуд і робоче місце.

ЛАБОРАТОРНИЙ ПОСУД

Всі роботи у лабораторіях здійснюються з використанням різного посуду 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°C). 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 та ін.

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

Посуд для вирощування ізольованих клітин (тканин).

Бутлі для глибокого культивування тканин і клітинних суспензій;

Колби Ерленмейєра

Пробірки біологічні

Чашки Петрі

Скельця предметні без ямки і з ямкою;

Скельця покривні

Матеріали: фільтрувальний папір, негіроскопічна вата, марля, ватні пробки, алюмінієва фольга для виготовлення ковпачків на колби, целофан, пергаментний папір, нейлонова тканина різної щільності.

ПЕРЕЛІК ПРИЛАДІВ ТА БАЗОВОГО ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ:

Ваги аналітичні;

Морозильна камера;

Мікроскоп;

Вортекс;

pH-метр;

Термостат;

Магнітна мішалка;
Шейкер;
Центрифуга/вортекс;
Дистилятор;
.Охолоджуюча центрифуга;
Автоклав;
Качалка для культивування мікроорганізмів;
Ламінарна шафа II класу захисту.

Ламінарна шафа (бокс) - лабораторне устаткування, шафа, для роботи з хімічними або біологічними об'єктами в стерильних умовах, призначена для запобігання забрудненню хімічних чи фізичних об'єктів, біологічних зразків або будь-яких інших матеріалів, чутливих до мікрочастинок.

Конструкція ламінарного боксу дозволяє працювати в стерильних умовах з мікроорганізмами в нестерильному приміщенні. Асептичні умови в ламінарі створюються за рахунок струменя стерильного повітря, забір якого відбувається з приміщення, і який стерилізується, проходячи через бактерицидні фільтри.

Автоклав (грец. αὐτός — сам і лат. clavis — ключ) — герметичний пристрій для здійснення технологічної обробки речовин в герметичній посудині під дією підвищених температур та надлишкового тиску.

Термостат лабораторний - призначений для отримання і підтримки стабільної температури, необхідної для проведення бактеріологічних, мікробіологічних, санітарно-бактеріологічних, вірусологічних і біохімічних досліджень. Термостати обладнані сучасною мікропроцесорною системою контролю температури та часу, сигналізацією про порушення режиму термостатування або про вихід з ладу. Температурний діапазон: кімнатна +5 °C до 70 °C.

Водяна баня - пристрій для нагрівання речовин, коли необхідна температура не перевищує 100 °C при нормальному атмосферному тиску.

Центрифуга лабораторна - пристрій, в якому швидке обертання використовується для розділу частинок суміші за масою. Центрифуга застосовується в біологічних дослідженнях для виділення речовин із певною молекулярною масою.

Шейкер лабораторний прилад призначений для тривалого перемішування рідин в різних ємностях. Прилад застосовують в лабораторіях для вирощування мікроорганізмів і екстракції біологічно активних речовин;

Дистилятор — це апарат, призначений для очищення води за рахунок її теплового перегону. Може бути настільного або промислового (лабораторного) типу.

Сушильна шафа - це економічна електропіч компактних розмірів, призначена для сушки, прожарювання і стерилізації значного переліку матеріалів при t до 60 °C, а також для здійснення аналітичних робіт.

Структура біотехнологічної лабораторії.

Лабораторія для біотехнологічних досліджень складається, як правило, з декількох приміщень, серед яких: приміщення для стерилізації середовищ, посуду та матеріалів, для приготування живильних середовищ, культуральна, лабораторна кімната, ламінарний бокс.

Живильні середовища готують у спеціальному приміщенні, оснащеній аналітичними, технічними, торсійними вагами, рН-метром. Це приміщення повинно містити достатню кількість шаф для зберігання готових поживних середовищ, хімічних реактивів і посуду.

У приміщенні для стерилізації встановлюють автоклави. За вимогами техніки безпеки автоклавну кімнату потрібно ізолювати від інших приміщень і забезпечити постійну вентиляцію повітря.

Перш за все, культивування фрагментів тканин і органів, а тим більше окремих клітин, вимагає дотримання повної асептики.

При всіх маніпуляціях з клітинами та тканинами при культивуванні *in vitro* дотримуються певних правил асептики у ламінар-боксі або в асептичних кімнатах. У першому випадку асептика досягається поданням профільтрованого стерильного повітря, що спрямоване назовні на працюючого. Асептичні кімнати стерилізують за допомогою ультрафіолетових ламп, а працюють у таких приміщеннях у стерильному одязі. Робочу поверхню столів в асептичних кімнатах та інструменти перед роботою додатково стерилізують спиртом.

Правила техніки безпеки при роботі з біооб'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.

Лабораторна робота №2

Ознайомлення з видами біооб'єктів для біотехнологічних виробництв

Теоретична частина

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 голандський вчений Антоніо Ван Левенгук за допомогою мікроскопа. Більшість живих об'єктів біотехнології складають мікроорганізми, які відносяться до 3-х надцарств: без'ядерні (акаріоти), доядерні (прокаріоти), ядерні (еукаріоти); 6-ти Царств: віруси, бактерії, архебактерії, рослини, тварини, гриби.

Мета роботи: ознайомлення з особливостями методів мікроскопічного дослідження біооб'єктів-продуцентів біотехнологічної продукції.

Матеріали та обладнання: суспензія добової культури дріжджів, плісняві гриби, наочні препарати сухих шапкових грибів, водорості (мікроцистіс, хлорела, живі лишайники; мікроскоп МБР-1, препарувальна голка, предметні і покривні скельця, пінцет, піпетка, скальпель.

Завдання:

Виготовити тимчасові препарати і розглянути за допомогою мікроскопічного методу представників різних груп мікроорганізмів (дріжджових клітин, пліснявих грибів: *Mucor*, *Aspergillus*; водоростей: *Microcistis*, *Chara*.

Хід роботи

1. На середину чистого, знежиреного предметного скла наносять краплю фізіологічного розчину або води.
2. У краплю води бактеріологічною петлею вносять невелику кількість бактеріальної культури і перемішують.
3. Обережно накривають покривним склом, попередньо поставивши його на ребро. Крапля тонким шаром заповнює простір між покривним і предметним склом.
4. Для видалення бульбашок повітря покривне скло обережно притискають скляною паличкою до предметного і видаляють фільтрувальним папером надлишки рідини.

Мікроскопія препаратів

Правила роботи із світловим мікроскопом:

1. Установіть мікроскоп у робоче положення, тобто так, щоб колонка штатива була повернена в бік дослідника, а дзеркало – у напрямку джерела світла.
 2. Центруйте мікроскоп. Для цього повертайте револьвер доти, поки об'єктив малого збільшення не стане в центрі отвору предметного столика (до відчуття легкого поштовху).
 3. Освітіть поле зору. Для цього, дивлячись в окуляр лівим оком і не закриваючи праве, повертайте дзеркало до джерела світла доти, поки поле зору не освітиться рівномірно. Не слід допускати попадання на дзеркало мікроскопа прямих сонячних променів.
 4. Покладіть препарат на предметний столик так, щоб об'єкт опинився над отвором столика під об'єктивом.
 5. Дивлячись з боку, за допомогою макрогвинтів опустіть тубус так, щоб об'єктив наблизився до препарату, але не торкався його.
- Забороняється опускати тубус, дивлячись при цьому в окуляр, це може призвести до псування препарату та об'єктива.
6. Дивлячись в окуляр, обертом макрогвинтів у зворотній бік (на себе), повільно піднімайте тубус, поки в полі зору не з'явиться чітке зображення об'єкта. Відстань від об'єкта до об'єктива при малому збільшенні складає приблизно 1 см.
 7. Під час роботи ліву руку тримати на мікрометричному гвинті, який злегка обертають не більше як на півоберта. Завдяки цьому досягається можливість розглядати як поверхневі, так і більш глибокі ділянки об'єкта. Препарат треба розглядати, повільно рухаючи його на предметному столику або повертаючи самий предметний столик.
 8. Переходячи з малого на велике збільшення, ще при малому збільшенні покладіть у центр зору ту частину об'єкта, яку треба вивчати.
 9. Обертом револьвера поставте над препаратом об'єктив великого збільшення. Дивлячись з боку, повільно і обережно опускайте тубус, щоб об'єктив(х40) майже наблизився до препарату, але не торкнувся його. Після цього, дивлячись в окуляр, повільно піднімайте тубус до появи обрисовування предмета. Для

наведення чіткості використовуйте тільки мікрогвинт. Відстань від об'єкта до об'єктива при великому збільшенні складає приблизно 1 мм.

10. Користуючись мікрометричним гвинтом, домагайтеся чіткого зображення об'єкта.

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			

Лабораторна робота №3

Ознайомлення з основними видами поживних середовищ, субстратів що використовують для культивування мікроорганізмів

Теоретична частина

Класифікація живильних (поживних) середовищ для культивування мікроорганізмів у біотехнологічних процесах.

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.

Натуральні середовища – це живильні середовища можуть бути з не точно визначеним складом, тобто включати біогенні (рослинні, тваринні, мікробні) речовини.

Синтетичні середовища можуть включати хімічні сполуки з визначеною кількістю, співвідношенням компонентів .

Напівсинтетичними – до натурального субстрату додаються речовини відомої хімічної природи). Найбільш поширеними є напівсинтетичні субстрати. У біотехнологічних процесах використовуються різні за фізичним станом живильні середовища (рідинні, тверді).

Мета роботи: ознайомитися з різними видами поживних середовищ, методами стерилізації посуду та живильних середовищ.

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, азотомісні речовини (6-7% від загальної маси сухого залишку), вітаміни, органічні кислоти, мінеральні солі.

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

– 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).

2. Синтетичні:

Синтетичні середовища широко використовують при дослідженні метаболізму мікроорганізмів. Існує багато прописів синтетичних середовищ, які забезпечують ріст різних мікроорганізмів.

Наприклад, середовище Чапека для культивування мікроскопічних грибів складається з глюкози – 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. Основним їх компонентом є синтетичні середовища, до яких додають у невеликій кількості такі речовини: пептон (джерело азотного живлення), дріжджовий екстракт (джерело вітамінів групи В, піримідинових і пуринових основ), гідролізат казеїну (джерело амінокислот). Напівсинтетичні середовища широко застосовуються в мікробіологічній промисловості для отримання вітамінів, антибіотиків, амінокислот.

Лабораторна робота №4

Методи стерилізації посуду та живильних середовищ

Мета заняття: оволодіння прийомами та методами підготовки стерильного посуду, інструментів, розхідних матеріалів.

Матеріали, обладнання: колби, чашки Петрі, піпетки, термостійкі склянки, фольга, фільтрувальний папір, ватні корки, сушильна шафа, автоклав

Стерилізація скляного посуду та інструментів.

Скляний посуд, вимитий, висушений і загорнутий в папір, стерилізують, в основному, гарячим повітрям у сушильних шафах при температурі 165-170°C протягом 2 год. Посуд можна стерилізувати при 120 °C протягом 1,5 годин. Посуд розгортають безпосередньо перед використанням.

Кожну піпетку загортають окремо в довгі смужки фольги чи пергаментного паперу шириною 4-5 см.

Попередньо вставляють ватні кульки у кінці піпеток. Обмотування починають з протилежного кінця поступовим рухом паперу по спіралі.

Папір повинна щільно охоплювати піпетку. Загорнуті піпетки загортають по кілька штук разом або поміщають в спеціальні металеві або картонні пенали. Шпателі обгортають окремо аналогічно піпеткам, використовуючи для обмотування смужки паперу більшої ширини. Чашки Петрі загортають разом по 2-4 штуки. Колби, пробірки та інший посуд з середовищем закривають ватними корками, а зверху папером.

Дрібні металеві лабораторні предмети (пінцети, бактеріологічні петлі та ін.) під час роботи можна стерилізувати пропалюванням у полум'ї пальника (фламбування) безпосередньо перед використанням.

На полум'ї також короткочасно обпалюють горлечка колб, пробірок, пляшок, ватні пробки при пересіві культур і розливі середовищ. У полум'ї спиртівки гинуть клітини і спори мікроорганізмів. Відпрацьовані піпетки з культурою опускають у дезінфікуючі розчини.

Методи стерилізації поживного середовища

Матеріали та обладнання: термостат; сушильна шафа; піпетки об'ємом 1 мл, 2 мл та 5 мл, піпетки об'ємом 1 мл, 2 мл та 5 мл, чашки Петрі, колби різних розмірів, скляні палички, бактеріологічні пробірки, металеві пінцети, бинти або марля, вата гігроскопічна, папір, нитки, ножиці.

Хід роботи:

М'ясо-пептонний бульйон (МПБ) розлити у 12 стерильних пробірок. Чотири пробірки кип'ятити 30 хв. Інші чотири – простерилізувати в автоклаві 15 хв. при 1 атмосфері. Останні чотири пробірки залишити без обробки. Після цього всі пробірки помістити у термостат при температурі 28–30⁰С і спостерігати за ними протягом 4–5 діб, відмічаючи зміни, які відбуваються в пробірках.

Результати досліджень свідчать, що тільки після автоклавування живильне середовище надовго залишається стерильним. При інших методах обробки у пробірках спостерігається утворення плівок та каламуті внаслідок розмноження бактерій.

Лабораторна робота №5

Загальна характеристика біотехнологічного процесу.

Елементи біотехнологічного процесу

Біотехнологічний процес – це виробничий процес, у якому використовується життєдіяльність організмів або продукти їх метаболізму.

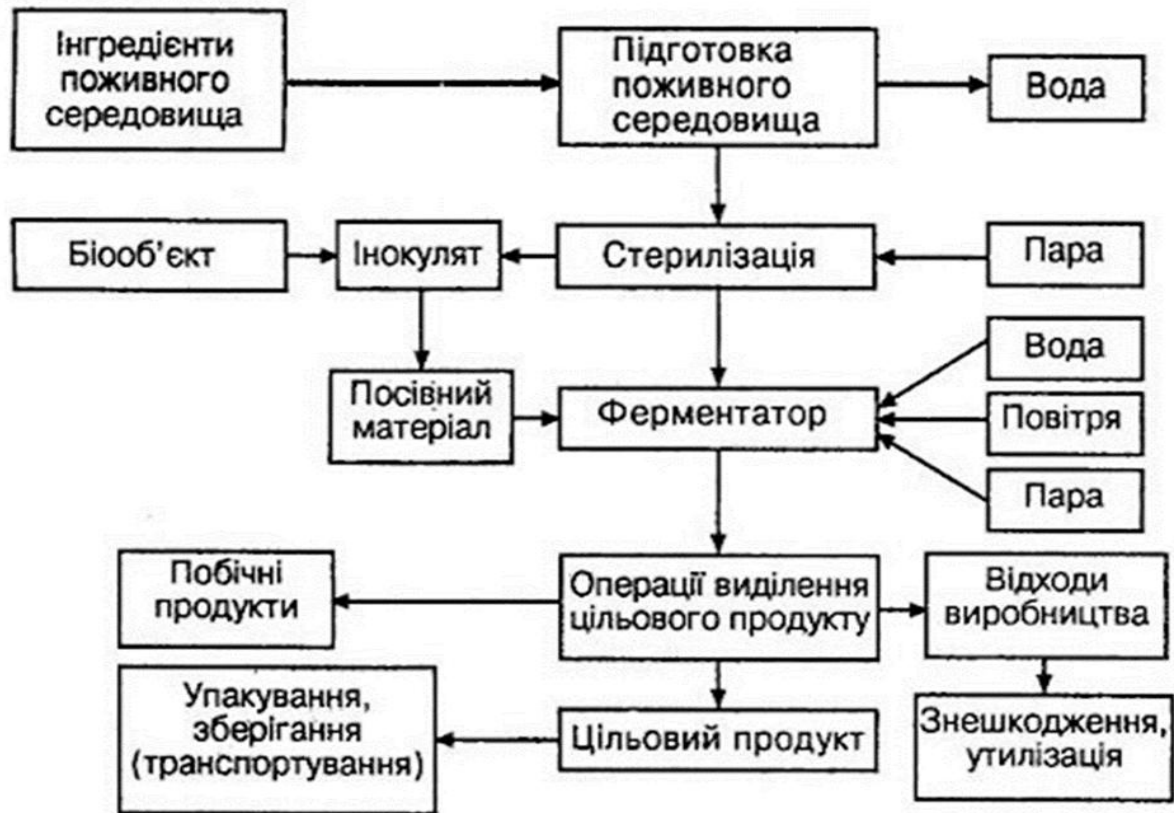
Основними елементами, що складають біотехнологічний процес, є: біологічний агент (біооб'єкт), поживне середовище (субстрат), технологічне обладнання і апаратура та кінцевий біотехнологічний продукт.

Біологічний агент є активним початком у біотехнологічних процесах і одним з найбільш важливих їх елементів.

Біотехнологічний процес включає три основні стадії:

- 1 – підготовчу (складається з двох процесів – підготовки поживного середовища і підготовки продуцента);
- 2 – біотехнологічну (культивування біооб'єкта);
- 3 – завершальну (відділення, очищення та модифікація цільового продукту).

Сучасний біотехнологічний процес мікробіологічного синтезу включає підготовку поживного середовища та необхідної культури мікроорганізму-продуцента; розмноження селекціонованої культури з метою накопичення посівного матеріалу; культивування продуцента у певних умовах; фільтрацію та відокремлення мікробної біомаси; виділення та очищення продукту.



Приблизна узагальнена схема процесів у біотехнології

Основою будь-якого біотехнологічного виробництва є штам – продуцент цільового продукту, тому дуже важливо зберігати протягом тривалого часу корисні властивості для здійснення основного біотехнологічного процесу.

На підготовчій стадії здійснюють зберігання та підготовку культури продуцента (інокулята); розмноження селекціонованої культури з метою накопичення посівного матеріалу; масштабування, тобто проводять послідовне нарощування біомаси продуцентів у колбах, бутлях, далі в серії послідовних ферментерів.

Також, на підготовчій стадії здійснюють підготовку поживних субстратів і середовищ.

Найважливішим елементом підготовки живильних середовищ є їхня стерилізація.

Основною стадією є біотехнологічна стадія (процес культивування продуцента) – це сукупність послідовних операцій від початку функціонування об'єкта до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації.

Вирощування мікроорганізмів чи інших біооб'єктів на живильних середовищах називається культивуванням (lat. cultus – вирощування), а вирощені мікроорганізми – культурою мікроорганізмів. При вирощуванні мікроорганізмів

у рідкому середовищі культури утворюють суспензії, осад або плівку, при вирощуванні на твердому середовищі – колонії. Колонія – це потомство однієї клітини, яка потрапила на агаризоване середовище. За виглядом колоній іноді можна розрізнити окремі види мікроорганізмів.

Рідке поживне середовище у якому ростуть клітини мікроорганізмів називається **культуранною рідиною**.

Обладнання для здійснення біотехнологічного процесу.

Промислове культивування біологічних об'єктів здійснюють у спеціальному обладнанні- біореакторах (ферментерах). Протягом певного періоду часу в апараті відбувається взаємодія продуцента і субстрату. У ферментерах вирощують бактерії і гриби для одержання антибіотиків, ферментів, органічних кислот, деяких вітамінів тощо.

У середовищі культивування(біореакторах) контролюють такі параметри:

- температуру
- рН середовища - за допомогою рН-електродів;
- тиск – за допомогою мембранних манометрів;
- в'язкість середовища – оцінюють потужність, яку потребує мішалка за різної швидкості обертання;
- уміст кисню .

Ферментація – процес , який складається з сукупності послідовних операцій від внесення у підготовлене середовище посівного матеріалу і до завершення процесу росту клітин або біосинтезу цільового продукту.

Біотрансформація – процес перетворення хімічної структури речовини під впливом ферментативної активності клітин мікроорганізмів або готових ферментів.

Біокаталіз –хімічне перетворення речовини з використанням ферментів-біокаталізаторів (культивування грибів шляхом ферментативного руйнування целюлозовмісних рослинних відходів);

- метанове бродіння–процес переробки органічних відходів за допомогою метаногенних мікроорганізмів в анаеробних умовах (виробництво біогазу з використанням органічних відходів);
- Біоокиснення – утилізація речовин-забруднювачів за участю мікроорганізмів або асоціації мікроорганізмів в аеробних умовах (початкова аеробна стадія силосування, очищення стічних вод з використанням біофільтрів);
- Біокомпостування – це зниження кількості шкідливих органічних речовин у твердих відходах за допомогою асоціації мікроорганізмів (наприклад, мікробне очищення ґрунту від нафтових забруднень);
- Біосорбція –процес поглинання шкідливих домішок із газів або рідин мікроорганізмами, які закріплені на спеціальних твердих носіях (наприклад, очищення стічних вод з використанням біофільтрів);
- Біодеградація – процес руйнування шкідливих сполук під впливом мікроорганізмів-деструкторів (анаеробна стадія силосування, мікробне розкладання пестицидів);
- Бактеріальне вилуговування – процес переведення нерозчинних сполук металів за допомогою мікроорганізмів у розчинний вигляд.

Завершальний етап біотехнологічного процесу складається з таких стадій:

1. Розділення культуральної рідини і біомаси.

Вихідним матеріалом для виділення продуктів мікробіологічного біосинтезу є культуральна рідина. Незалежно від локалізації продукту (позаклітинний чи внутрішньоклітинний метаболіт) стадією підготовки культуральної рідини для подальшої переробки є відділення біомаси. Фракціонуванням на біомасу та рідку частину (фугат) отримують живу (хлібні дріжджі, бактеріальні добрива та інші), ослаблену (вакцини) або кормовий білок) клітинну масу і продукти різного ступеня очищення.

Для отримання біомаси клітин необхідно відділити клітини від культуральної рідини використовують такі методи: відстоювання, фільтрації, сепарації, центрифугування, мікрофільтрації, ультрафільтрації, коагуляції, залежно від особливостей біомаси продуцента, що утворюється.

2. Стабілізація цільового продукту (очистка і концентрування).

Основні процеси очищення і концентрування продуктів біотехнології: вакуум-випарювання, виморожування, осадження, мембранні процеси, сорбція, кристалізація і сушіння.

Однією з перспективних товарних форм продуктів біотехнології є концентрати.

Завдання

1. Наведіть схему біотехнологічного виробництва з урахуванням процесів, що відбуваються на кожній його стадії.
2. Заповніть таблицю 5.

Таблиця 5

Складові біотехнологічного виробництва

Біотехнологічне виробництво	Біотехнологічні стадії			
	Сировина, мікробна культура	Основна стадія (вид бродіння)	Готова продукція	Вид відходів, утилізація
Спиртове виробництво				
Виробництво біогазу				
Вермикомпостування				
Очищення стічних вод				

Тема: Вибір об'єктів біотехнологічних виробництв. Основи селекційної роботи.

Теоретична частина

Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів. Мікроорганізми, які використовуються у біотехнології, належать до різних фізіологічних і таксономічних груп та істотно відрізняються одні від одних за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками.

З більш як 100 000 відомих видів мікроорганізмів у промисловості використовують відносно мало – близько 100 видів, до яких належать кілька тисяч штамів.

Відбір мікроорганізмів

Перший шлях. Відбирають зразки з місцевості, де вірогідність продуцента найбільша. Наприклад, вуглеводокислюючі мікроорганізми, винні дріжджі на винограді, анаеробні целюлозорозкладаючі та метаноутворюючі мікроорганізми в великих кількостях знаходяться у рубці траводіних.

Зразки вносять в рідкі поживні середовища спеціального складу – елективні. В цих середовищах створюються вибіркові умови для розвитку того чи іншого мікроорганізму.

Другий шлях. Мікроорганізми можна отримувати з колекцій мікроорганізмів. При цьому користуються знаннями фізіології та біохімії різних мікроорганізмів. Так, продуцентів антибіотиків частіше всього знаходять серед актиноміцетів, типові продуценти етанолу – дріжджі, для грампозитивних бактерій характерно виділення гідролітичних ферментів.

Усі процеси життєдіяльності мікроорганізму направлені на безупинний ріст та поділ до тих пір, поки середовище буде містити мінімальні умови для цього. Усі процеси у бактеріальній клітині підпорядковані жорстким правилам економії. Жоден з первинних метаболітів не утворюється більше необхідного. Для промислових завдань генетична програма клітини повинна бути перебудована таким чином, щоб спрямувати потенціал біосинтезу клітини не на самовідтворення, а на виробництво необхідного продукту.

Наступний етап – виділення чистих культур. Використовують щільні поживні середовища, на які засівають зразки з накопичувальних культур. Окремі клітини утворюють ізольовані колонії з яких отримують чисті культури.

Одноклітинні організми характеризуються більшою швидкістю синтетичних процесів, ніж вищі форми життя. Так, корова масою 500 кг за добу синтезує 0,5 кг білка. Таку ж кількість білка за добу можна отримати від 5 г дріжджів.

Фототрофні мікроорганізми перспективні як продуценти аміаку, водню, білку та різних біопрепаратів.

Термофільні мікроорганізми оптимально ростуть при високих температурах (60-80°C). Серед термофілів виявлені продуценти спиртів, амінокислот, ферментів, молекулярного водню. Використання термофілів дозволить знизити затрати на стерилізацію обладнання.

Швидкість росту у термофілів у 1,5-2,0 рази вища, ніж у мезофілів. Термофіли *Thermus caldophilus* та *T. aquaticus* синтезують протеази стійкі до нагрівання. Активність протеази при 20 °C у 100 разів нижча, ніж при 75°C.

Отже, у промисловості застосовують три типи штамів:

1. природні штами, вдосконалені природним або штучним відбором;
2. змінені в результаті індукованих мутацій;
3. одержані методами генної або клітинної інженерії.

Стратегія селекційної роботи з мікроорганізмами:

пошук природних форм, які володіють корисними якостями для людини (синтез цінної сполуки, висока швидкість росту, здатність до засвоєння дешевих та доступних матеріалів);

– створення на їх базі промислових штамів.

Це відбувається шляхом зміни регуляції метаболічної активності мікробної клітини.

Методи сучасної селекції – генетичне конструювання, тобто сукупність маніпуляцій, за допомогою яких змінюють генетичну програму мікроорганізмів.

Внесення клітин мікроорганізмів чи іншого дослідного матеріалу (зразки ґрунту, проби води) в стерильне живильне середовище для отримання накопичувальної культури називається посівом.

Перенесення вже вирощених клітин з одного середовища до іншого (стерильного) називається пересівом.

Культивування мікроорганізмів за певної температури називають інкубуванням (лат. *incubatio* – вирощування за штучно створеної температури).

Різноманітність метаболічних процесів у клітинах мікроорганізмів визначають їх різні потреби в поживних елементах. Невіддільною частиною субстрату є вода як розчинник поживних сполук.

Лабораторна робота №6

Методи одержання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів

Мета роботи: ознайомитися з методами культивування мікроорганізмів.

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

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

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

- розплавляють стерильне агаризоване сусло 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 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.

Лабораторна робота №7

Загальне ознайомлення з калюсною культур рослин

Підбір експлантів, ознайомлення зі складом поживного середовища.

Теоретична частина

Культура клітин і тканин – це штучне *in vitro* індукування ділень клітин або вирощування в пересадковій культурі тканин, що виникли шляхом проліферації клітин ізольованих сегментів різних частин рослини.

Всі об'єкти, що культивуються *in vitro*, вирощуються стерильними.

Клітинні культури є клітинами певної тканини, які отримано від рослин або тварин, що вирощуються в штучних умовах на поживному середовищі. Клітинні культури набули широкого застосування в різних галузях біології і

медицини, зокрема, широко застосовуються в наукових дослідженнях як модельні об'єкти.

У природі калюсоутворення – природна реакція на пошкодження рослин. В культурі ізольованих тканин при переміщенні експланта (тобто фрагмента тканини або органу) на поживне середовище його клітини дедиференціюються, переходять до поділу, утворюючи однорідну недиференційовану масу – калюс.

Калюсною тканиною вищої рослини називають тканину, яка виникла шляхом неорганізованої проліферації із експлантів органів рослин після першого субкультивування. Крім того, калус утворюється в місцях пошкодження рослин. Відомий вчений – ботанік Н.Кренке 50 років тому частину своїх робіт присвятив вивченню ролі калусної тканини в цілій рослині.

Всі об'єкти, що культивуються *in vitro*, вирощуються стерильними. Стерилізуються вихідні шматочки тканини рослин (експланти), поживне середовище; антисептично в спеціальних боксах стерильним інструментом проводяться маніпуляції з вирощування об'єктів.

Основою для підбору поживних середовищ слугували поживні розчини, які використовувались для вирощування цілих рослин. Основоположниками методу *in vitro* були Уайт і Готре .

На сучасному етапі для культивування клітин, тканин і органів використовують різноманітні модифікації середовищ стосовно до окремих випадків культивування тканин і органів різних видів рослин: Мурасіге і Скуга (1962р.), Ніча (1969р.), Гамборга (1968р.), Шенка (1972р.).

Завдання: Вивчити особливості компонентного складу живильних середовищ і ознайомлення з загальною методикою культивування тканин рослин.

У культурі *in vitro* застосовують рідкі й агаризовані (тверді) живильні середовища. Рідкі середовища використовуються для культивування суспензій, калусів, ізольованих органів і тканин, рослин-регенерантів. При цьому для підтримки експлантів у пробірці із середовищем поміщають спеціальні місткі-підтримки з фільтрувального паперу або синтетичних пористих матеріалів.

Агаризовані середовища готують на основі агар-агару – полісахариду з морських водоростей, що утворює із водою гель при рН 5,6–6,0.

Будь-яке поживне середовище для вирощування культури ізольованих рослинних тканин включає до свого складу наступні компоненти:

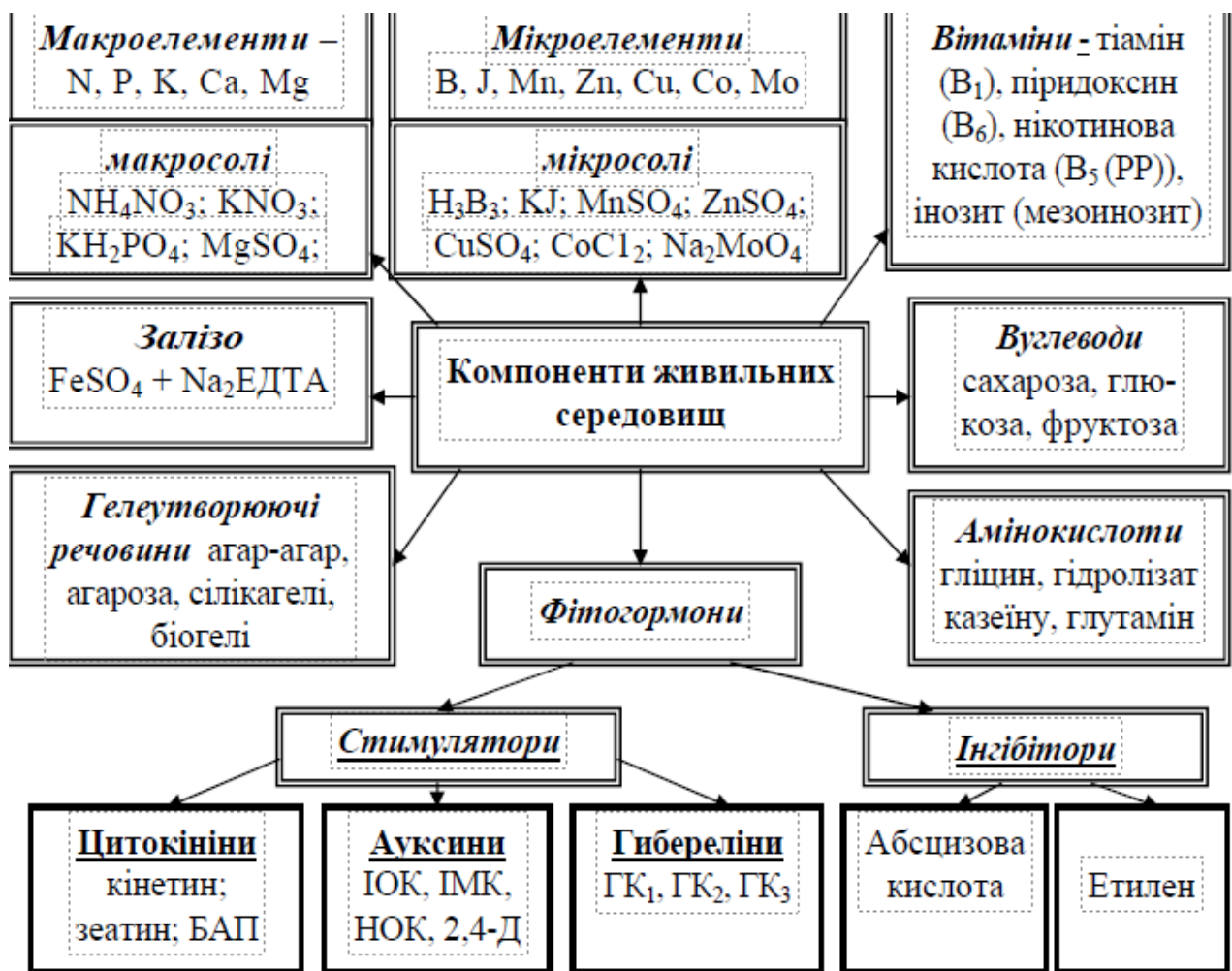


Рис. 1. Компонентний склад живильних середовищ для культивування тканин рослин

1. Загальна методика культивування тканин рослин
2. Для отримання культури рослинних тканин використовують фрагменти різних органів вищих рослин. Фрагменти тканин різних органів, які використовуються для культивування, називаються експлантами. Експланти поміщають на живильне середовище *in vitro* у пробірки, колби, чашки Петрі.
3. Процес культивування рослинних тканин потребує стерильних умов. Для цього за допомогою розчинів, які містять активованій Хлор або Гідраргіум (гіпохлорити, сулема) стерилізують експланти, після чого їх ретельно відмивають стерильною водою.
4. Живильне середовище стерилізують в автоклаві чи за допомогою фільтрування на ультрафільтрах. Посуд, інструменти, матеріали стерилізують в автоклавах (2 атм) при 160 °C упродовж 1,5 год. Перенесення експлантів на живильне середовище здійснюють у ламінарних боксах, де асептика досягається постійною подачею стерильного повітря. Експланти поміщають на агаризоване середовище і злегка втискають їх в агар для забезпечення тісного контакту з середовищем

Контрольні запитання

1. Вкажіть дисципліни, з якими пов'язана біотехнологія
2. Надайте сучасне визначення біотехнології.
3. Вкажіть основні цілі біотехнології.
4. Вкажіть основні завдання біотехнології.
5. Вкажіть, на які періоди розподіляють історію розвитку біотехнології?
6. Охарактеризуйте емпіричний період.
7. Охарактеризуйте етіологічний період.
8. Охарактеризуйте біотехнічний період.
9. Охарактеризуйте геннотехнічний період – ера новітніх біотехнологічних процесів.
10. Які види біооб'єктів застосовують у біотехнологічному виробництві?
11. У чому полягає роль поживного середовища (субстрату) в біотехнологічному виробництві?
12. Які середовища називаються натуральними?
13. Які середовища називаються синтетичними?
14. Які середовища називаються напівсинтетичними?
15. Які головні особливості мікроорганізмів.
16. Яке значення мікроорганізмів для розвитку біотехнологічних наук.
17. Вкажіть які продукти отримують у наш час за допомогою методів традиційної біотехнології.
18. Охарактеризуйте основні специфічні методи біотехнології.
19. Вкажіть напрями застосування клітинної інженерії.
20. Вкажіть напрями застосування генетичної інженерії.
21. У чому полягає роль поживного середовища (субстрату) в біотехнологічному виробництві?
22. Які досягнення клітинної інженерії застосовують у тваринництві?
23. Вкажіть напрями застосування досягнення біотехнології у харчовій промисловості.
24. Вкажіть найбільш перспективні напрями використання біотехнології в медицині.
25. Вкажіть найбільш перспективні напрями використання біотехнології в тваринництві.
26. Вкажіть найбільш перспективні напрями використання біотехнології в рослинництві.
27. Вкажіть найбільш перспективні напрями використання біотехнології в екології.
28. У чому полягає роль поживного середовища (субстрату) в біотехнологічному виробництві?
29. У чому полягає суть методу культури клітин, тканин та органів рослин?
30. Охарактеризуйте основні етапи становлення методу культури клітин, тканин та органів рослин.
31. Яке практичне застосування методу культур тканин?
32. Назвіть загальні принципи організації біотехнологічної лабораторії.
33. Який посуд використовують для роботи з культурою клітин, тканин та органів рослин?
34. Як здійснюється стерилізація посуду та допоміжних матеріалів?

35. Які методи стерилізації інструментів?
36. Які групи речовин входять до складу живильного середовища для вирощування *in vitro* клітин, тканин та органів рослин?
37. Назвіть основні живильні середовища, які використовують для культивування ізолюваних клітин, тканин та органів рослин.
38. Вкажіть, з яких стадій складається біотехнологічний процес.
39. Які процеси відбуваються на підготовчій стадії?
40. У чому полягає процес масштабування продуцента?
41. Що таке «чисті культури», яким чином їх отримують?
42. Які прилади використовують у біотехнологічній лабораторії?
43. Назвіть загальні принципи організації біотехнологічної лабораторії.
44. Який посуд використовують для роботи з культурою клітин, тканин та органів рослин?
45. Як здійснюється стерилізація посуду та допоміжних матеріалів?

ГЛОСАРІЙ ОСНОВНИХ ТЕРМІНІВ

Адсорбція – поверхнєве 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.

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

Бродіння – анаеробний ферментативний окислювально-відновний процес отримання енергії, в якому від субстрату (донора) відщеплюється водень (або електрони) та переноситься на продукти.

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.

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

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.

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 синтезують 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 агрівання 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.

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.

Штам – культура одного й того ж виду, яка виділена з різних субстратів.

Список використаної літератури

1. Біотехнологія : навч. посіб. / О. О. Воронкова та ін. Дніпро : Ліра, 2018. Т. 1. 200с.
2. Біотехнологія. Навчальний посібник / за ред. Гиль М. І. Миколаїв: МДАУ, 2012. 476с.
3. Буценко Л. М., Пирог Т. П. Біотехнологічні методи захисту рослин: підручник К.: Видавництво Ліра, 2018. 346 с.
4. Гаркава К. Г., Косоголова Л. О., Карпов О. В., Ястремська Л. С. Біотехнологія. Вступ до фаху: навч. посіб. К.: НАУ, 2012. 296 с.
5. Грегірчак Н. М., Антонюк М.М., Буценко Л. М.. Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології: Навч. посіб. К.: НУХТ, 2015. 267 с.
6. Драницина А.С., Савчук О.М., Гребіник Д.М., Кравченко О.О., Остапченко Л.І. Методичні рекомендації до розділу "Молекулярна біотехнологія" курсу "Загальна біотехнологія" К.: КНУ ім.Тараса Шевченка, 2018. – 185 с.
7. Кляченко О. Л., Коломієць Ю. В., Антіпов І. О. Біотехнологія. Ч. 1. Сільськогосподарська біотехнологія. К.: ЦП «Компринт», 2015. 300 с.
8. Кунах, В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. –К. : Логос, 2005. – 730 с.
9. Курта С.А. Промислові біотехнології. Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника. Івано-Франківськ, 2018. 197с.
10. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології: Лабораторний практикум .За наук. ред. чл.-кор. НАН України, проф. Д. М. Говоруна. К.: Академперіодика, 2010. 232 с.
11. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л., Коломієць Ю. В. Біоінженерія. К.: ЦП«Компринт», 2015. 550 с.
12. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин – К. :Поліграфконсалтинг, 2013. – 520 с.
13. Методичні вказівки до виконання практичних робіт з курсу Вступ до фаху для студентів спеціальності .Промислова біотехнологія» усіх форм навчання Укл.: О.В.Кузнецова, С.М. Лисицька. Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2008. 45 с
14. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Біотехнологія рослин. К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. – 114 с.
15. Пирог Т.П. Антонюк М.М., Скроцька О.І., Кігель Н.Ф.. Харчова біотехнологія: підручник Т. П. Пирог, М. М. Антонюк, О. І. Скроцька, Н. Ф. Кігель. К.: Вид. Ліра-К, 2016. 426 с.
16. Пирог, Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія.– К. : Нац. ун-т харчових технологій, 2009. – 335 с.
17. Пирог. Т.П. Харчова біотехнологія: підручник Т.П. Пирог М.М. Антонюк, О.І. Скроцька, Н.Ф.Кігель. К.: Вид. Ліра-К, 2016. 426 с.
18. Сатарова Т. М., Абраїмова О.Є., Вінніков А.І., Черенков А.В. Біотехнологія рослин. Дніпропетровськ : Адверта, 2016. – 136 с.
19. Сільськогосподарська біотехнологія : курс лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія» денної форми навчання. О. Ю. Сметана. Миколаїв : МНАУ, 2017. 132 с.
20. Трофимчук І. М., Плюта Н. В., Логвиненко І. П. Біотехнологія з основами екології. Київ: Кондор, 2019. 304с.

21. Філімоненко О.Ю. Конспект лекцій з дисципліни „Загальна біотехнологія” для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти за освітньо-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія» зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія Кам'янське. ДДТУ.2019. 158 с.
22. Чебан Л.М. Загальна біотехнологія: навчально-методичний посібник. – Чернівці: Чернівецький нац.ун-т, 2017. – 116 с.
23. Юлевич О. І. Біотехнологія : навчальний посібник О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.

Штапенко Оксана Всеволоодівнаа
Шемедюк Наталія Петрівна
Двилюк Іванна Іванівна

НАВЧАЛЬНЕ ВИДАННЯ

ВСТУП ДО ФАХУ

Методичні вказівки для лабораторних та самостійних робіт

**здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»**

Підписано до друку 26.11.2024 р. Формат 60x84 ^{1/16}
Папір офсетний. Тираж 100 прим.
Видавництво “Папірсу”