

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

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

*кафедра біотехнології
та радіології*

Методичні вказівки

*до виконання лабораторних робіт з
дисципліни*

„Загальна Біотехнологія”

*для студентів денної та заочної форм навчання за
спеціальністю*

162 «Біотехнології та біоінженерія»

Львів - 2020

УДК 60(072)

Методичні вказівки розглянуті та рекомендовані до друку на засіданні кафедри (протокол № 13 від 28.02.2019 року) та на засіданні методичної комісії за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» (протокол № 2 від 28.02.2019 року)

Укладач:

д. с.-г. наук, професор Буцяк В.І.

Рецензнт:

доктор сільськогосподарських наук, професор, завідувач кафедри технології виробництва молока і яловичини ЛНУВМтаБТ імені С.З.Гжицького Шаловило С.Г.

© Буцяк В.І., 2020 р.

Загальні положення

Лабораторні роботи є важливим етапом навчального процесу, що дозволяє вдосконалювати теоретичну й практичну підготовку студентів, які проводяться паралельно з теоретичним курсом, що дає можливість глибше й повніше засвоїти матеріал. Лабораторні заняття з курсу “Загальна біотехнологія” виконуються відповідно до навчального плану підготовки студентів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія.

Лабораторні роботи містять виклад принципу біотехнологічного методу, перелік основних матеріалів, реактивів й устаткування, докладний опис ходу роботи й очікуваних результатів. Побудова робіт дозволяє проводити їх без додаткових методичних вказівок, що особливо актуально в цей час у зв’язку з необхідністю підготовки студентів до самостійного рішення наукових проблем.

Метою дисципліни “Загальна біотехнологія” є формування системних знань, умінь і навичок щодо вивчення умов і особливостей культивування біологічних агентів – продуцентів цільових продуктів, методів керування процесами біосинтезу, способів та прийомів промислової реалізації біотехнологічного процесу. Метою також є ознайомлення студентів із принципами розробки біотехнологій, формування у біотехнолога системних знань щодо обігу, включаючи зберігання й транспортування, користування інформацією й передачу інформації про біотехнологічні препарати споживачам.

Основним **завданням** вивчення дисципліни є формування в студентів практичних умінь і навичок, виходячи зі знань основ молекулярної біології й генетики продуцентів, удосконалювання виробництва методами генетичної інженерії й інженерної ензимології, розробки та виготовлення біотехнологічних препаратів, оцінки якості сировини, живильних середовищ, напівпродуктів і цільових продуктів, вироблення в студентів здатності правильно оцінювати відповідність біотехнологічного виробництва правилам GMP, відповідність вимогам екологічної безпеки, стосовно до використовуваного на виробництві біооб’єктам-продуцентам і цільовим продуктам, фундаментальних основ методів контролю якості одержуваних біотехнологічними методами.

У результаті вивчення навчальної дисципліни “Загальна біотехнологія” студент повинен бути здатним продемонструвати такі результати навчання:

знати:

- стан та перспективи розвитку сучасної біотехнології, класифікації біотехнологічних процесів та виробництв та сфери їх застосування;
- основні групи продуктів біосинтезу та продуцентів БАР, сировинну базу та принципи створення поживних середовищ, які використовуються в біотехнології;
- основні стадії біотехнологічного процесу, способи культивування клітин мікроорганізмів, рослин, тканин у лабораторних та промислових умовах та забезпечення асептики в біотехнологічній практиці;
- визначати доброякісність мікроорганізмів-продуцентів методом мікроскопії, визначення концентрації життєздатних клітин й їхньої ферментативної активності та принципи математичного моделювання кінетики розвитку популяцій біологічних агентів. Забезпечити необхідні умови зберігання промислових штамів;
- урахувати вплив біотехнологічних факторів на ефективність технологічного процесу і якість кінцевого продукту;
- підтримувати оптимальні умови для біосинтезу цільового продукту й вирішувати ситуаційні завдання при відхиленнях від цих умов;
- основні нормативні документи, що ставляться до виробництва, контролю якості, дотриманню екологічної безпеки, зберігання, міжнародним і вітчизняним стандартам стосовно до одержуваних біотехнологічними методами цільових продуктів;

вміти:

- знайти місце конкретної технології у системі відомих біотехнологій, обґрунтувати вибір технологічних способів та прийомів ведення біотехнологій;
- розрахувати та вибрати основні технологічні параметри біотехнологій, вибрати продуцент біологічно активної речовини;
- провести контроль основних показників ходу технологічного процесу і готової продукції.
- проводити практичну роботу з нормативною документацією (НД): лабораторними, дослідно-промисловими регламентами тощо;
- здійснювати експлуатацію біореакторів і коректування технологічних параметрів ферментації.

Основні вимоги з техніки безпеки

Особливістю робіт у біотехнологічній лабораторії є постійний контакт працівників лабораторії з біологічно-небезпечним матеріалом: культурами мікроорганізмів, тканинами, кров'ю і виділеннями живих організмів тощо. Тому всі працівники лабораторії зобов'язані дотримуватись наступних правил роботи, які забезпечують стерильність у роботі та попереджують можливість зараження:

1. До приміщення лабораторії заборонено заходити без спеціального одягу – халату.

2. Не дозволяється виходити за межі лабораторії в халатах або одягати верхній одяг на халат.

3. Двері лабораторії повинні бути постійно зачиненими.

4. В приміщенні лабораторії категорично заборонено палити, вживати їжу, зберігати продукти харчування.

5. При використанні біологічного матеріалу не дозволяється ставити посуд, який містить матеріал для дослідження, безпосередньо на стіл. Для цього використовуються підноси або кювети, посуд попередньо протирають ззовні дезінфікуючим розчином.

6. Переливання рідин, які містять мікроорганізми, здійснюють над посудиною з дезінфікуючим розчином.

7. У випадках пошкодження посуду з мікробіологічним матеріалом або його витіканням слід негайно повідомити відповідальній особі та провести заходи щодо обеззараження забрудненого одягу, частин тіла, предметів робочого місця.

8. При роботі з мікробіологічним матеріалом необхідно використовувати загальноприйняті технічні прийоми, які виключають можливість контакту рук з мікробіологічним матеріалом.

9. По закінченні роботи непотрібний біологічний матеріал та культури мікроорганізмів повинні бути знищені. Інструменти, які використовувалися в роботі, та поверхню робочого столу необхідно дезінфікувати.

10. Необхідно також пильно слідкувати за чистотою рук – після закінчення роботи руки дезінфікуються.

11. Мікробіологічний матеріал та культури мікроорганізмів, які потрібні для подальшої роботи, здаються відповідальній особі.

Лабораторна робота №1

Тема. Асептика в біотехнологічній промисловості.

Мікробіологічний контроль ефективності різних методів стерилізації.

Мета: Вивчити антибактеріальну дію фізичних, хімічних та механічних способів стерилізації.

Завдання: Експериментально дослідити бактероцидну дію високих температур, ультрафіолетового проміння та антисептичних речовин.

Теоретичні основи

Біотехнологічні процеси, як правило, проводять в асептичних умовах, хоча можуть бути виключення для деяких з них. Наприклад, при культивуванні окремих еукаріот (дріжджі) у негерметизованих ферментаторах (нестерильний процес) відбувається помітне зниження рН середовища, де домінування дріжджів не змінюється за надходження контамінуючих бактерій (від лат. **contaminatio** – забруднення, зараження) – вони не можуть скласти конкуренції основному виду.

Асептика (від греч. *a* – не, немає, *sepsis* – гниття) – це комплекс заходів, що спрямовано на запобігання надходження до середовища (об'єкта) сторонніх мікроорганізмів. Отже, асептика в біологічній технології і, наприклад, у хірургії – це не одне й те ж поняття. У першому випадку припускають використання якого-небудь біооб'єкта (зокрема – мікроба) та повне виключення надходження інших мікроорганізмів, що є забруднювачами. У другому випадку прагнуть виключити будь-яку можливість потрапляння патогенних мікробів і мікробів-контамінатів на операційне поле або у рану.

Кожен з матеріальних потоків у біотехнологічних процесах – потенційне джерело мікробів-контамінатів. Джерелом сторонніх мікроорганізмів у біотехнологічних процесах є сировина (компоненти поживного середовища), обладнання, вода, повітря та самі працівники.

Асептика може включати вологе прибирання приміщень, обробку їх ультрафіолетовими променями, антисептичними засобами, використання стерильних інструментів, середовищ, технологічного одягу, подачу стерильного повітря (столи з ламінарним потоком стерильного повітря в боксових приміщеннях, надходження у ферментатор стерильного повітря через барботер – від франц. **barbotage** – перемішування) тощо. Отже комплекс засобів, що забезпечує асептику біотехнологічних процесів, включає: механічний, фізичний та хімічний захист біооб'єкта і місця його

існування, а за необхідності й кінцевий продукт. До механічного захисту належать: видалення механічних домішок, наприклад, з повітря, культиваторів, герметизація устаткування, ізоляція вузлів та з'єднань; до фізичної – обробка повітря та поверхонь приладів і апаратів ультрафіолетовими променями, кип'ятіння, стерилізація паром під тиском, обробка ультразвуком; до хімічної – обробка поверхонь хімічними антисептиками.

З водою у сферу технологічного процесу можуть потрапляти грамнегативні бактерії з групи ентеробактерій, псевдомонад і деяких інших. У природних відкритих водоймах виявляються целюлозоруйнуючі, нітрифікуючі та денітрифікуючі бактерії, ціанобактерії, амоніфікатори, залізобактерії та багато інших. Лише вода артезіанських колодязів, глибоких свердловин і джерел відрізняється високою чистотою. Слід пам'ятати, що чим більше вода забруднена органічними речовинами, тим більше в ній міститься мікробів. З урахуванням всіх характеристик необхідно здійснювати підготовку води для використання її в технологічних процесах.

Люди, зайняті в біотехнологічному виробництві, також можуть бути джерелом контамінуючої мікрофлори – грамнегативних бактерій, коків, мікоплазм, вірусів тощо. Тільки на поверхні шкіри може зосереджуватися до 10^{10} мікробних клітин. Найбільш забрудненими є руки, ступні, лікті, шия, груди, пахові ділянки. Різноманітна і численна мікрофлора ротової порожнини: бактерійні та кокові форми, вібріони, спірили і спірохети, нокардії, дифтероїди, протозойні організми, аспорогенні дріжджі роду **Candida**, мікоплазми, віруси та ін. При розмові, кашлі, чханні мікроби у великій кількості потрапляють у повітря. Встановлено, що здорова людина за одне чхання виділяє до 20000 мікробних клітин, здатних розповсюджуватися по горизонталі, в середньому, до 1,5 м. Крапельки носового слизу, слини і мокроти, підсихаючи, утворюють частинки, покриті білковою або глікопротеїновою оболонкою, що містять мікробні клітини. У таких частинках мікроорганізми тривало зберігаються і можуть бути причиною нестерильності матеріалів (об'єктів).

Джерелом мікробів-забруднювачів можуть бути деякі компоненти поживних середовищ, наприклад, кукурудзяний екстракт (фаги, дріжджі тощо). Рослинні віруси часто виявляються в культурах калусних тканин та у культурах клітин тваринних тканин і клітин людини, оскільки вони є сприятливими середовищами для контамінаційної мікрофлори. Мікроби-контамінанти не тільки можуть пригнічувати розвиток та функції біооб'єкта через конкуренцію, але й дезорганізовувати будь-яку тканину

– середовище вирощування; більш того, деякі з них здатні продукувати токсичні речовини, які можуть потрапити в цільовий продукт (так само як і самі мікроби-забруднювачі).

Захист біотехнологічних процесів від мікробів-контамінантів ефективно здійснюється за допомогою різних фільтрів. Останнім часом широкого розповсюдження набула мембранна фільтрація в цілях отримання стерильних повітря та різних рідин (різновид холодної стерилізації). Більш того, мембрани знайшли застосування в рекомбінантних ДНК-біотехнологіях, в дисперсійному та інших аналізах біомолекул. Багато термолабільних речовин стерилізують такими ж способами.

У біотехнології, незалежно від умов проведення процесів, широко використовують стерильне повітря, що подається: у ферментатори для аеробних організмів; у спеціальні приміщення у вигляді ламінарних потоків для асептичного приготування лікарських засобів, у розпилювальні сушарки тощо. Стерилізуюча мембранна фільтрація тут виявляється найбільш прийнятною.

Промисловий випуск мембранних фільтрів був початий з кінця 40-х років минулого століття. Згідно з Р.Е. Кестінгом (1971) найбільш поширеними процесами фільтрації є звичайна фільтрація (її можна назвати макрофільтрацією), мікрофільтрація, ультрафільтрація, діаліз (зворотний осмос). Для макрофільтрації застосовують зазвичай паперові або скляні фільтри. При цьому відокремлюють частинки, розміри яких знаходяться в межах від 1 до 10^3 мкм. Для інших типів фільтрації використовують нітроцелюлозу, ацетилцелюлозні, полівінільні, поліамідні, фторвуглеводневі мембрани товщиною менше 0,1 мкм із високим ступенем пористості. У випадках мікрофільтрації відокремлюють частинки розмірами $10\text{--}2 \times 10^2$ мкм, у випадках ультрафільтрації розміри макромолекул, що відділяються при цьому, знаходяться приблизно у межах від 0,001 до 0,02 мкм, а їх молекулярні маси відповідають 1–1000 кДа.

У процесі діалізу через мембрани відокремлюють невеликі молекули, що співставляються за розміром з молекулами розчинника (10^{-3} мкм і менше). Тут речовини розділяються унаслідок різних швидкостей дифузії через мембрану. Розчини, що підлягають стерилізації фільтруванням, повинні зберігатися перед розливом і при подальшому розливі в асептичних умовах. При цьому час між початком приготування розчину та його стерилізацією фільтруванням повинен бути якомога менше. Будь-

який фільтр, що використовується для стерилізуючої фільтрації, не винен якісно і кількісно змінювати кінцевий продукт.

Повітря, що подається у ферментатори, повинне бути чистим та стерильним. У цих випадках використовують також інші матеріали, що фільтрують, якими заповнюються загальні та індивідуальні (для кожного ферментатора) фільтри, наприклад, з перхлорвінілу (у фільтрах Петрянова – ФП), скловати та ін. Профільтроване повітря стискується у компресорах, охолоджується в теплообміннику, надходить у ресивер (від англ. *receiver* – ємкість), що знімає пульсацію повітря і лише після цього надходить через барботер у культуральну рідину.

Поживне середовище перед засівом біооб'єктом також повинно бути стерильним. У таких випадках застосовують теплову стерилізацію, яка забезпечує зберігання стабільності інгредієнтів середовища. У мікробній біотехнології зазвичай використовують методи періодичної і безперервної стерилізації. Першу з них здійснюють в апаратах малої ємності безпосередньо у ферментаторах глухою або гострою парою під тиском ($2,03 \cdot 10^5$ Па) впродовж 30-40 хв за температури 134°C після видалення повітря з апарату за нагрівання до 100°C. Потім середовище охолоджують водою через змішувач або сорочку апарату та засівають тим або іншим біооб'єктом.

Метод безперервної стерилізації заснований на тому, що концентрат поживного середовища подають насосом через систему конструкцій, що включає нагрівач, витримувач (власне стерилізатор) та теплообмінник (охолоджувач, в якому охолодження середовища відбувається до температури, оптимальної для культивування клітин). Названі вище методи знезараження відносять до найбільш поширених, проте, враховуючи необхідність стерилізації досить широкого асортименту різних матеріалів, доводиться вдаватися також до інших способів.

Матеріали, реактиви та обладнання: чиста культура *Saccharomyces cerevisiae*, м'ясопептонний агар (МПА), сусло-агар (СА), середовище Сабуро, чашки Петрі, пробірки мікробіологічні, піпетки на 1–2 мл, бактеріологічна петля, тонкі предметні стекла, покривні стекла, спиртівка (брикети сухого пального), кювета з містком для фіксованих препаратів, розчини метиленового синього (1:40), фуксину основного, генціанвіолету, імерсійна олія, бензин, серветки, фільтрувальний папір, дезінфікуючий розчин, дистильована вода, МБР (мікроскоп біологічний робочий), електроплитка.

Порядок виконання роботи

Робота проводиться в три етапи.

I. На першому занятті приготувати поживне середовище для проведення експерименту: (підготовка може відбуватися на першому занятті лабораторної роботи №1).

1. МПА для роботи із бактеріальною культурою, наприклад *Bacillus subtilis*.

2. Приготувати 100 мл середовища Сабуро для роботи з грибною культурою, наприклад дріжджі роду *Saccharomyces* (%) 100 мл: цукроза (глюкоза) – 4; пептон – 1; KH_2PO_4 – 0,05. Для глибинного культивування до 40 мл додати 2,0-2,5% агар-агару.

3. Приготувати посуд до стерилізації:

– великі пробірки – 5 шт.;

– чашки Петрі – 4 шт.

Поживне середовище розлити в пробірки та піддати стерилізації.

II. На другому занятті провести засів рідкого та агаризованого (попередньо розплавленого) поживного середовища Сабуро культурою мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* або будь-якою іншою бактерійною культурою. Після цього середовище простерилізувати різними методами.

1. Вивчення антибактеріальної дії високих температур.

У чотири пробірки з поживним середовищем помістити по 2 краплі суспензії досліджуваного мікроорганізму. Першу пробірку піддати автоклавуванню, другу – кип'ятінню впродовж 20 хв (100°C), третю витримати у сухожаровій шафі впродовж 20 хв (60°C), четверту (контроль) залишити за кімнатної температури. Посіви витримати в термостаті за 28°C упродовж 4-7 діб.

2. Вивчення антибактеріальної дії УФ-променів

Суспензію досліджуваного мікроорганізму помістити на стерильне годинникове скло та опромінити лампою БУВ-30 упродовж 15 хвилин на відстані 10–20 см від центру лампи. Опромінену та неопромінену (контроль) суспензії засіяти в поживне середовище та інкубувати в термостаті за сприятливої температури.

3. Визначення антимікробної дії антисептичних речовин

До суспензії досліджуваного мікроорганізму додати невелику кількість антисептичної речовини: фенолу (5%), лізолу (5%), хлорного вапна (10%), етилового спирту (70%), ацетатної кислоти. Потім цими культурами мікроорганізмів засіяти поживне середовище. Як контроль використовувати необроблену культуру. Посіви витримати в термостаті.

Диски із фільтрувального паперу змочити розчинами досліджуваних речовин і помістити на поверхню поживного агаризованого середовища в чашки Петрі, засіяні газом тест-культурою. Чашки інкубувати в термостаті. Всі досліди провести в декількох (2-3) повторностях.

III. На третьому занятті проаналізувати отримані результати.

Інтенсивність зростання та облік мікроорганізмів провести кількісно (під мікроскопом у камері Горяєва або нефелометрично). Про антибактеріальну дію антисептичних речовин, при дослідженні на щільному поживному середовищі, судять по зонах затримки росту мікроорганізму навколо дисків. Всі дані занести у табл. 1 та зробити висновки.

Таблиця 1. Інтенсивність росту мікроорганізмів за дії антисептичних речовин.

№ п/п	Стерилізуючий фактор	Інтенсивність росту мікроорганізмів

Контрольні питання:

1. Що таке асептика?
2. Що таке дезінфекція?
3. Що таке антисептика?
4. Наведіть джерела інфекції під час виробництва біотехнологічного продукту?
5. Наведіть методи стерилізації поживних середовищ.
6. Наведіть методи стерилізації за принципом дії.
7. Перелічить методи стерилізації спрямовані на створення умов для відмирання мікрофлори.
8. Наведіть приклади фізичних методів стерилізації.
9. Наведіть приклади хімічних методів стерилізації.
10. Наведіть приклади механічних методів стерилізації.
11. Поясніть методику механічного фільтрування та можливості її застосування.

Лабораторна робота № 2

Тема. Контроль повітря виробничих приміщень біотехнологічних підприємств

Мета роботи: Ознайомитися з методами контролю чистоти повітря на біотехнологічних підприємствах.

Завдання: Дослідити седиментаційним методом (метод осадження) концентрування мікроорганізмів у виробничих та побутових приміщеннях біотехнологічних підприємств.

Теоретичні основи

У виробничих умовах джерелами мікробів-контамінантів 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, рози 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 тощо.

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 аерозолі, стійкість якої залежить від розмірів (величини) часток, їх електричного заряду й поверхневої енергії.

Необхідно пам'ятати, що у випадку знаходження на частках аерозолі мікробних клітин, то їх негативний електричний заряд буде привносити свою частку в загальний заряд частки. Спираючись лише на величину аерозолі, що містить мікроорганізми, можна виділити три фази його: крупноядерну (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 впродовж 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 1,0 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, діоксида титану, дорожнього пилу, вапна, каоліну, корунду, карбіду кремнію, мармуру, оксиду олова, скловолокна тощо. 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.

Матеріали, реактиви й устаткування:

Термостат, чашки Петрі, м'ясопептоний, дріжджовий агар або сусло-агар, лупа.

Хід роботи:

Для визначення кількості мікроорганізмів у 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 у приміщення та поміщають на розгорнутий папір, в якому вони стерилізувалися. Не перевертаючи, зсувають кришки на самий край чашки так, щоб вся поверхня агаризованого середовища була відкрита повністю.

Чашки залишають відкритими 5, 10 або 15 хвилин (час експозиції) залежно від забруднення приміщення. Потім їх закривають кришками, перевертають уверх дном і поміщають в термостат. Чашки м'ясопептонним та дріжджовим агаром витримують 24 год за температури 37°C, з сусло-агаром – 48 год за 30°C. Підрахунок колоній

здійснюють візуально за допомогою лупи. Для розрахунку користуються формулою, запропонованою В.Л.Омелянським, згідно якої на поверхні чашки в 100 см² осаджується впродовж 5 хвилин стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 10 л повітря. Кількість мікроорганізмів в 1 м³ повітря вираховуємо за формулою:

$$X = a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100 / (bT),$$

де: а – число колоній які вирости в чашках Петрі (середнє з двох);

б – площа чашки Петрі, см²

Т – час експозиції, хв;

100 – перерахунок площі чашки на 100 см²;

5 – експозиція чашки за Омелянським, хв.;

100 – перерахунок на 1м³

Результати досліджень записуємо в зошит та робимо висновок.

Контрольні питання:

1. Чому необхідно слідкувати за чистотою повітря в виробничих приміщеннях?
2. Якими методами можливо здійснити стерилізацію повітря в виробничих приміщеннях.
3. За якою формулою розраховують кількість мікроорганізмів в повітрі?
4. Якими чинниками визначається ефективність роботи фільтрів для стерилізації повітря?
5. Під дією яких механізмів відбувається видалення будь-яких частинок з повітря (в т.ч. й бактерій) за мінімальної продуктивності фільтру?
6. Які є основні вимоги до технічних систем очищення та стерилізації повітря на біотехнологічних виробництвах?
7. Якими способами користуються для стерилізації повітря на біотехнологічних підприємствах?
8. На які фази, за величиною, поділяються частинки аерозолі, що містять мікроорганізми?

Лабораторна робота № 3

Тема. Контроль якості води на біотехнологічних підприємствах

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

Завдання: Визначити загальну кількість мікроорганізмів у воді.

Теоретичні основи

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 на 0,25; 0,5 й 1,0 л) ретельно миють, закривають ватно-марлевими пробками, накривають паперовими ковпачками, зав'язують у горловини й стерилізують в автоклаві за 120°C упродовж 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, суворо 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 (рис. 1).

Батометр опускають у воду та на необхідній глибині, потягнувши за мотузку. Після заповнення склянки мотузку опускають та пробка автоматично закривається. Піднявши барометр, металічну пробку замінюють ватною. На бутилках 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 за температури не вище 35°C.

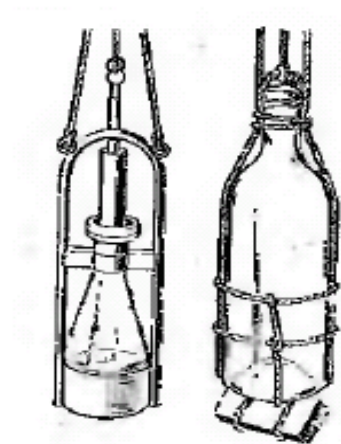


Рис. 1. Прилади для відбору проб води з глибини.

Норми вмісту мікроорганізмів у воді. Санітарно-гігієнічну оцінку якості води проводять на підставі показників, які виражають кількістю кишкових паличок у 1000 мл води (колі-індекс) або найменшим обсягом, що містить одну кишкову паличку, виражених у мілілітрах (колі-титр):

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

За діючому ДСТУ для питної води, що пройшла очищення, титр кишкової палички повинен бути не нижче 300, колі-індекс – не більше 3; загальна кількість бактерій в 1 мл 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 колі-титр не менше 500 (2-3 кишкові палички 1 л)

б) вода колодязів і джерел можуть містити не більше 100 бактерій в 1 мл і мати колі-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 й існують як сапрофіти, в зовнішній середовищі. У групу кишкової палички входять три роди, що відносяться до родини *Enterobacteriaceae*: рід *Escherichia* (*E. coli*, *E. coli* var. *coliforme*, *E. coli* var. *aureescens*), рід *Citrobacter* (*C. freundii*, *C. freundii* var. *parafrenes*, *C. freundii* var. *intermedium*) і 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.

За оцінки якості питної води за діючим ДСТУ враховують кишкові палички, які зброджують глюкозу з утворенням кислоти та газу за 35-37°C упродовж 24 год. Це короткі грамнегативні 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 0,5-1,0-2,0 мкм, більшість рухливі, які ростуть в широкому діапазоні температур (15-55°C), мають температурний оптимум близько 37°C, гинуть за 60°C упродовж 15 хв, аероби або факультативні анаероби. На МПА через добу утворюють прозорі із сірувато-блакитним відтінком колонії, з розпливчастими або хвилястими краями. При вирощуванні на рідких поживних середовищах дають сильне помутніння й сіруватий осад, плівки не утворюють. Желатину не розріджують.

Матеріали, реактиви й устаткування:

Дослідна вода, чашки Петрі середовища МПА та Ендо, колби, піпетки, термостат, центрифуга.

Хід роботи:

Визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл води. Стерильними піпетками відбирають по 1 мл досліджуваної води й її розведення (1:10) та 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 впродовж 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. За наявності в 1 мл від 0 до 100 колоній 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 витримуванням чашок за температури 37°C упродовж 24 год. Результати досліджень записуємо в зошит та робимо висновок.

Контрольні питання:

1. Що таке колі-індекс?
2. Що таке колі-титр?
3. Які вимоги до якості води, яка використовується в біотехнологічному процесі?
4. До групи кишкової палички входять мікроорганізми, що відносяться до родин: ...
5. Згідно вимог діючого ДСТУ, які норми вмісту мікроорганізмів у воді?
6. Якими способами користуються для стерилізації води на біотехнологічних підприємствах?
7. Методи очистки та стерилізації води, яка використовується в технологічному процесі біотехнологічних підприємств.
8. Методика розрахунку ефективності термічної стерилізації води та технологічних рідин.

Лабораторна робота №4

Тема. Оптимізація складу поживних середовищ для культивування промислових штамів – продуцентів біологічно активних речовин.

Мета: Оптимізація якісного та кількісного складу середовища для росту дріжджів роду *Saccharomyces*.

Завдання: Встановити оптимальний склад поживного середовища за концентрацією основних елементів живлення та фізико-хімічними параметрами.

Теоретичні основи

Оптимізація біологічного процесу зводиться до експериментального визначення умов, за яких вихід процесу (накопичення біомаси або будь-якого продукту життєдіяльності) досягає максимального значення. Умови протікання процесу визначаються комплексом чинників, від яких залежить його вихід. При оптимізації процесу культивування мікроорганізму покращують склад поживного середовища та умови культивування мікроорганізмів: температуру, рН, перемішування, освітлення, аерацію та ін.

Оптимізацію можна проводити за усією сукупністю чинників, що впливають на процес за допомогою математичного планування експерименту. Це достатньо трудомістке дослідження. На практиці часто доводиться стикатися з більш вузьким завданням підбору оптимального складу середовищ за заданих умов культивування, тобто при постійному рівні решти чинників. З фізіологічних констант можна вивести загальну форму залежності врожаю культури від концентрацій кожного окремого компонента середовища. Вид цієї залежності надано на рис. 2.



Рис. 2. Залежність врожаю культури від концентрації окремого компонента середовища

Відрізок АВ відповідає ділянці концентрацій, які лімітують врожай культури (“лімітуюча ділянка”); відрізок ВС – ділянка, в межах якої зміна концентрації даного компонента не викликає помітної зміни врожаю (“стаціонарна ділянка”); відрізок CD – ділянка, в якій ріст культури пригнічується надмірною концентрацією компонента (“інгібіруюча ділянка”). Для різних компонентів загальний вид залежності буде зберігатися, але набуває індивідуальних особливостей, що виражаються в різному нахилі та кривизні ділянок АВ і CD, протяжності ділянки ВС. Розглянутий вид залежності визначає вплив одного чинника на врожай культури.

Проте при складанні середовищ, що є сукупністю багатьох компонентів, потрібно враховувати ефект їх сумісного впливу на величину врожаю. Вибір критерію оптимізації визначається конкретними вимогами завдання. Величина критерію оптимізації, тобто “вихід процесу” може бути виражений різними одиницями (оптичною щільністю суспензії, числом клітин, сухою масою тощо). В усякому разі, критерій оптимізації повинен бути безперервною чисельною величиною в усьому інтервалі існування біологічної системи, виміряти яку дослідник може за допомогою наявних у його розпорядженні засобів (приладів). Важливим моментом є вибір тривалості досліджуваного процесу, оскільки він впливає на хід процесу. Проте, оскільки максимальна біомаса для екстенсивної культури накопичується в стаціонарну фазу, для якої характерна відсутність зміни біомаси в часі, представляється можливим заздалегідь призначити час досліду, відповідний цій фазі. Практичне вирішення даної задачі полегшується тим, що тривалість стаціонарної фази для більшості відомих культур мікроорганізмів порівняно велика.

При підборі середовища для культури, що оптимізується, необхідно вибрати найбільш відповідні форми хімічних сполук, у яких присутні, перш за все, біогенні елементи (C, N, P, S), а також макро- і мікроелементи. Особливо важко це зробити у відношенні до азоту (що використовується у вигляді NO_3 , NH_4^+ , $\text{R}-\text{NH}_2$, NO_2 , N_2 тощо) та вуглецю (хімічна форма якого визначає фізіологічний тип живлення мікроорганізмів, авто- або гетеротрофія). Як відомо, багато організмів здатні використовувати велике число хімічно різнорідних джерел вуглецю та азоту, причому частина з них залучається до процесів метаболізму одночасно і незалежно один від одного. Це дає підставу іноді включати до складу середовища декілька різних сполук вуглецю.

Таким чином, першим етапом вибору оптимального складу середовища є якісний відбір необхідних для даної культури хімічних

форм біогенних елементів. Вирішення цієї задачі може бути значно полегшено наявністю апріорних даних про культуру, що вивчається. В основу складу середовища, що оптимізується, може покладатися раніше відомий для цієї культури склад середовища, до якого повинні бути додані речовини, що надають позитивний ефект на ріст культури.

Наступним етапом є кількісна оцінка впливу відібраних компонентів на врожай досліджуваної культури. З числа компонентів середовища виділяють тільки ті, зміна концентрацій яких найсильніше позначається на врожаї, що дозволяє провести ранжування компонентів відповідно до міри їх впливу на врожай культури.

Хлібопекарські дріжджі роду *Saccharomyces cerevisiae* є біомасою дріжджових клітин, що містять багатий комплекс біологічно активних речовин та володіють ферментною активністю, яка забезпечує інтенсивне зброджування цукрів борошна та розпушування тіста. Дріжджі багаті вітамінами (рибофлавін, ергостерин, пантотенова, нікотинова та фолієва кислоти) і тому є цінним продуктом для вітамінізації хлібобулочних виробів. У зв'язку з цим, хлібопекарські дріжджі роду *Saccharomyces cerevisiae* було обрано об'єктом дослідження для оптимізації складу поживних середовищ для культивування промислових штамів – продуцентів біологічно активних речовин.

Дріжджі – це однопідродні клітини (відносно мікроорганізмів мають великі розміри) еукаріотичної будови, відносяться до родини грибів (мікроскопічні), але не мають здатності утворювати гіфи, характеризуються хемогетеротрофним типом живлення, є факультативними анаеробами та мезофільними організмами, розмножуються брунькуванням або діленням.

Дріжджі не зброджують поліцукриди (крохмаль, клітковину), тому для їх культивування треба застосовувати моноцукриди або проводити попередню обробку сировини (зазвичай рослинної) амілолітичними та іншими ферментами для оцукрювання поліцукридів поживного середовища до простих моноцукридів – глюкози. Оптимальним середовищем для культивування дріжджів є середовище Сабуро – поживне середовище для грибів: складається з 2%-го агарового гелю, 1%-го пептону, 4%-ї мальтози, рН 6,5–7,0. Стерилізують дане середовище впродовж 15 хв за 120°C. Для зберігання грибів застосовують “середовище зберігання”, аналогічного складу, але без додавання вуглеводу.

Матеріали, реактиви та обладнання:

Чиста (або накопичувальна) культура *Saccharomyces cerevisiae*, глюкоза, пептон, сульфат амоніаку, цукроза, мальтоза, лактоза, агар, м'ясопептонний агар, пивне сусло, чашки Петрі, піпетки на 1–2 мл, бактеріологічна петля, тонке предметне та покривне скло, спиртівка (брикети сухого пального), кювета з містком для фіксованих препаратів, розчини: метиленового синього (1:40), фуксину основного, генціанвіолету, імерсійна олія, бензин, серветки, фільтрувальний папір, дезінфікуючий розчин, дистильована вода.

Порядок виконання роботи

Робота проводиться за трьома етапами.

На першому занятті:

1. Для з'ясування здатності культури дріжджів розвиватися на середовищах з різними вуглеводами необхідно приготувати 200 мл середовища наступного складу (г/100 мл): пептон – 0,2; KH_2PO_4 – 0,25, вода водопровідна. Розлити середовище в 5 колб по 60 мл у кожную. У 1-у колбу додати глюкозу, у 2-у – лактозу, у 3-у – мальтозу, у 4-у – цукрозу. Цукри додавати в концентрації 2%. Середовище в 5-ій колбі – контрольне, тобто не містить джерела Карбону. Всі приготовані середовища розлити по 20 мл у 10 мікробіологічних пробірок (по 2 пробірки на кожен варіант). Заздалегідь у кожную пробірку внести поплавок запаяним кінцем догори. Поплавок повинен бути цілком заповнений середовищем. Пробірки з середовищами віддати на стерилізацію при 0,5 атм.

2. Приготувати середовище для з'ясування аерації на ріст дріжджів. Для цього в дві пробірки та дві конічні колби налити один і той же об'єм пивного сусла (8°C) або середовища Сабуро. Шар поживного середовища в колбах повинен бути не більше 1 см, що забезпечить вільний доступ кисню, тоді як шар рідини в пробірках повинен бути якомога вище, щоб ускладнити доступ кисню. Середовища в колбах та пробірках віддати на стерилізацію при 0,5 атм.

Готуємо 140 мл середовища (цукроза/глюкоза – 5%, пептон – 1%, KH_2PO_4 – 0,05%). 40 мл середовища використовуємо для дослідження аерації (по 10 мл у кожную з 2-х пробірок та по 10 мл у кожную з 2-х колб). 100 мл середовища розливаемо в 2 колби: 60 мл середовища залишаємо рідким, до 40 мл додаємо 2–2,5% агару і піддаємо стерилізації за 1 атм. Для дослідження стерильності із застосуванням бактеріальної культури треба застосовувати МПБ (60 мл) та МПА (40 мл).

3. З метою оптимізації середовища за концентрацією вуглеводу необхідно приготувати 40 мл поживного середовища, що містить 1% пептону. Розлити середовище в 2 колби по 20 мл у кожену. У першу колбу внести 1% глюкози (цукрози), у другу – 10%. Розлити по 10 мл у 4 мікробіологічні пробірки і віддати на стерилізації за 0,5 атм.

4. Приготувати і піддати стерилізації 20 мл поживного середовища із 5% глюкозою (розлити по 10 мл у 2 пробірки), але без пептону. Як джерело азотного живлення використовувати сульфат амоніаку в концентрації 0,5%. Результати порівняти з досліджуваними пробами за впливу аерації (у пробірках) при застосуванні 5% глюкози та 1% пептону.

5. Розлити водопровідну воду у 10 пробірок по 10 мл і віддати на стерилізацію за 1 атм.

6. Підготувати до стерилізації 5 піпеток на 1–2 мл та 4 чашок Петрі.

На другому занятті:

1. Приготувати суспензію чистої культури дріжджів у стерильній водопровідній воді (провести мікроскопію, оцінити чистоту та фізіологічний стан дріжджів).

2. Провести досліди для з'ясування впливу аерації на ріст культури дріжджів і виявлення їх здатності використовувати цукор та джерела вуглецю. Засіяти поживні середовища в пробірках і колбах однаковою кількістю (2–3 краплі) приготованої суспензії. Поставити на культивування в термостат, через добу помістити в холодильник до наступного заняття.

На третьому занятті:

1. Порівняти ріст дріжджів у різних умовах аерації. Вивчити морфологічні особливості дріжджів, звернути увагу на спосіб розмноження, провести мікроскопічні дослідження на наявність глікогену і волютину. Приготувати тимчасовий препарат “роздавлена крапля”, із використанням метиленового синього (1:40) для визначення співвідношення мертвих і живих клітин. Ріст культури оцінити нефелометрично.

2. Дослідити інтенсивність росту дріжджів на різних варіантах середовищ залежно від концентрації основного субстрату, що вміщує вуглеводи та джерела азотного живлення. Для цього зробити підрахунок клітин у камері Горяєва. Аналогічно, приготувати мікроскопічні препарати та проаналізувати фізіологічний стан дріжджів після культивування на дослідних середовищах. Результати дослідження (у відносних одиницях) занести в табл. 2. Оформити роботу, зробити висновки.

Таблиця 2. Інтенсивність росту дріжджів залежно від концентрації основного субстрату

№ середовища	Інтенсивність зростання	Компоненти поживного середовища, г/100 мл		
		Глюкоза або цукроза	Пептон	Сульфат амоніаку
1		1	1	-
2		5	1	-
3		10	1	-
4		5	-	0,5

Контрольні питання:

1. Що розуміють під поняттям “оптимізація умов культивування мікроорганізмів”?
2. “Поживне середовище” – це...?
3. Наведіть класифікацію живильних середовищ за фізичним станом, хімічним складом та призначенням.
4. За якими елементами проводиться оптимізація складу живильних середовищ під час культивування мікроорганізмів?
5. Від чого залежить вибір сировини, що використовується для приготування живильних середовищ?
6. Назвіть та коротко охарактеризуйте фази зростання мікроорганізмів при періодичному культивуванні.
7. За типом вуглецевого живлення мікроорганізми поділяються на...?
8. За відношенням до температури мікроорганізми поділяються на...?
9. За споживанням кисню мікроорганізми поділяються на...?
10. Перелічити оптимальні умови культивування хлібопекарських дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae*?

Лабораторна робота № 5

Тема. Одержання чистих культур мікроорганізмів

Мета: Опанувати методикою виділення чистих культур мікроорганізмів.

Завдання: Приготувати препарат “роздавлена крапля” для дріжджових і мікроскопічних грибів й “фіксований мазок для бактерій”. Провести мікроскопіювання, описати морфологічні ознаки препаратів: форми клітин, їх сполучення й розміри. Підрахувати кількості колоній, які вирости в чашках Петрі, описати їх культуральні ознаки.

Теоретичні основи

У біотехнологічних виробництвах як один з видів вихідних матеріалів використовують чисту культуру мікроорганізмів. Чистою культурою (ЧК) називають популяцію, що представляє собою нащадки 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 нащадків цієї клітини на поживних середовищах, ізольованих від інших видів. Для посіву найчастіше 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 (рис. 3). 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. Готовлять розведення матеріалу в 10–100 разів і більше (залежно від передбачуваного рівня контамінації мікроорганізмами) та роблять посів розведень, користуючись поверхневим або глибинним методом.

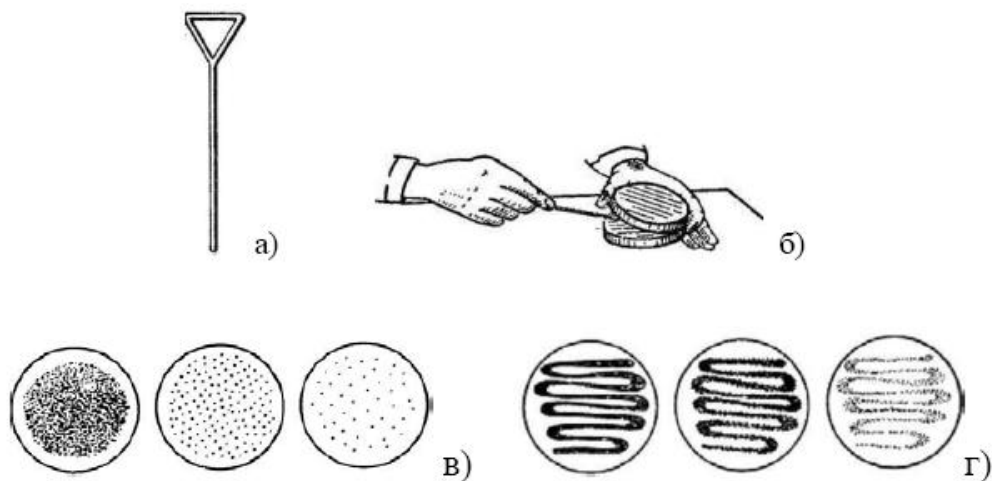


Рис. 3. Посів мікроорганізмів на поверхню щільного середовища в чашках Петрі.

а – шпатель Дригальського; б – положення чашки й руки при посіві шпателем; в – ріст мікроорганізмів після засіву шпателем; г – ріст мікроорганізмів після засіву петлею.

Посів в рідке середовище можна проводити петлею або піпеткою (пастерівською або градурованою). 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. У пробірки з м'ясо-пептонним агаром посів бажано проводити уколом (рис. 4).

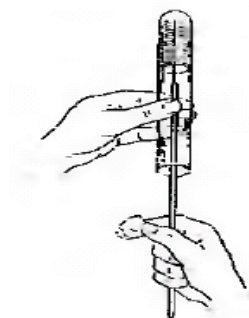


Рис. 4. Посів культури мікроорганізмів в щільне середовище уколом.

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 (рис.5).

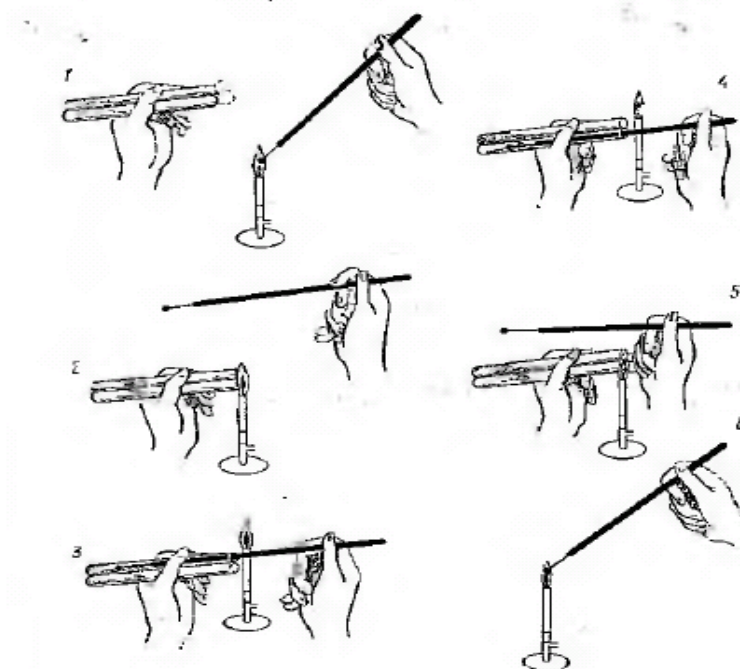


Рис. 5. Пересів культури мікроорганізмів

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, притискують 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 косого слою агару, то для охолодження петлі спочатку слід 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 слідє вказувати вік культури, склад середовища, умови культивування.

Культуральні властивості мікроорганізмів установлюють за особливостями росту на поживних середовищах. На рідких поживних середовищах відзначати характер розподілу культури – рівномірне, викликає помутніння середовища, придонне або поверхнєве, що обумовлено відношенням мікроорганізмів до кисню повітря. Мутність середовища може бути пластівчастої, однорідної. 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 клітини, та її будова залежить від особливостей розподілу клітин даного виду мікроорганізмів. Найбільше типово видові ознаки виражені у поверхневих колоніях:

- 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 ферментною 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.

Матеріали, реактиви й устаткування:

Термостат, чашки Петрі, пробірки, бактеріологічні петлі, піпетки, поживні середовища, предметні та покривні скельця, фарбники, досліджувальний матеріал, мікроскоп, пальник, спирт, колби.

Хід роботи:

Робота виконується у два етапи. На першому етапі (перше заняття) студенти використовують харчові продукти, що мають один або кілька

пошкоджень мікробіологічного походження для виділення чистої культури й візуального вивчення.

Заняття 1. У зошиті вказують, за наступною схемою, вихідні дані досліджуваного об'єкта. Потім варто приготувати препарат “роздавлена крапля” для дріжджових та 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.

Після закінчення вивчення необхідно класифікувати виявлені мікроорганізми за їх приналежністю – мікоміцети, дріжджі, бактерії.

Далі виконуються операції щодо виділення чистої культури мікроорганізмів методом Дригальського:

1. Взяти кожному студентові для посіву по дві чашки Петрі з м'ясопептоним 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°C, із суслон-агаром при – 32°C.

6. Зробити висновки та оформити роботу.

Заняття 2. 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 переважачого типу на щільних середовищах (МПА, СА).

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 умов 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.

4. Зробити висновки та оформити роботу.

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?

Лабораторна робота № 6

Тема. Визначення числа клітин мікроорганізмів висівом на поживні середовища

Мета: Опанувати методику визначення числа мікробних клітин.

Завдання: Приготувати поживне середовище Блаурокка (середовище для культивування бактерій *Bifidobacterium bifidum*) та провести посів розведень мікробної культури на чашки Петрі. Провести підрахунок колоній і математично розрахувати кількість клітин у колонії.

Теоретичні основи

На відміну від підрахунку мікроорганізмів під мікроскопом цей метод дає можливість визначити тільки число життєздатних клітин у популяції. Оскільки середовищ, придатних для росту всіх мікроорганізмів, не існує, метод висіву дає можливість визначити число мікроорганізмів, здатних рости на середовищі даного складу, але не дозволяє врахувати ті мікроорганізми, які не ростуть або ростуть у край повільно. Це важливо пам'ятати при аналізі таких природних субстратів, як ґрунт, вода тощо.

Визначення кількості клітин висівом на щільні поживні середовища (чашковий метод Коха). Метод широко застосовують для визначення чисельності життєздатних клітин у різних природних субстратах й у лабораторних культурах. У його основі лежить принцип Коха, відповідно до якого кожна колонія є нащадком однієї клітини. Це дозволяє на підставі числа колоній, що вирости після посіву на щільне поживне середовище певного обсягу досліджуваної суспензії, судити про вихідний вміст у ній клітин мікроорганізмів. Результати кількісного обліку мікроорганізмів, проведенного методом Коха, часто виражають не в числі клітин, а в умовних одиницях – так званих колонієутворюючих одиницях (КУО). Визначення числа мікроорганізмів цим методом включає три етапи: готування розведень, посів на щільне середовище в чашки Петрі й підрахунок колоній, що вирости.

1. Приготування розведень. Чисельність популяції мікроорганізмів зазвичай велика, тому для одержання ізольованих колоній необхідно приготувати ряд послідовних розведень. Розведення готують у стерильній водопровідній воді або 0,85%-вому розчині NaCl (фізрозчин). У ході досліду доцільно використовувати той самий коефіцієнт розведення, наприклад 10, що зменшує ймовірність помилки.

Для приготування розведень, стерильну водопровідну воду розливають по 9 мл у стерильні сухі пробірки. Потім 1 мл досліджуваної суспензії стерильною піпеткою переносять у пробірку з 9 мл стерильної води – це 1-ше розведення, 10^{-1} . Отримане розведення ретельно перемішують новою стерильною піпеткою, вбираючи в піпетку й випускаючи з її отриману суспензію. Цю процедуру виконують 3–5 разів, потім тією же піпеткою відбирають 1 мл отриманої суспензії й переносять в 2-гу пробірку – одержують 2-ге розведення (10^{-2}). У такий же спосіб готують і наступні розведення. Ступінь розведення залежить від щільності досліджуваної популяції мікроорганізмів; відповідно вона тим більше, чим більше щільність популяції. Для готування кожного розведення варто обов’язково використати нову піпетку.

2. *Посів*. Висівати суспензію можна поверхневим або глибинним способом. Перед посівом поверхневим способом (рис. 6) розливають розплавлене, найчастіше агаризоване поживне середовище в ряд стерильних чашок Петрі по 15–20 мл у кожну.

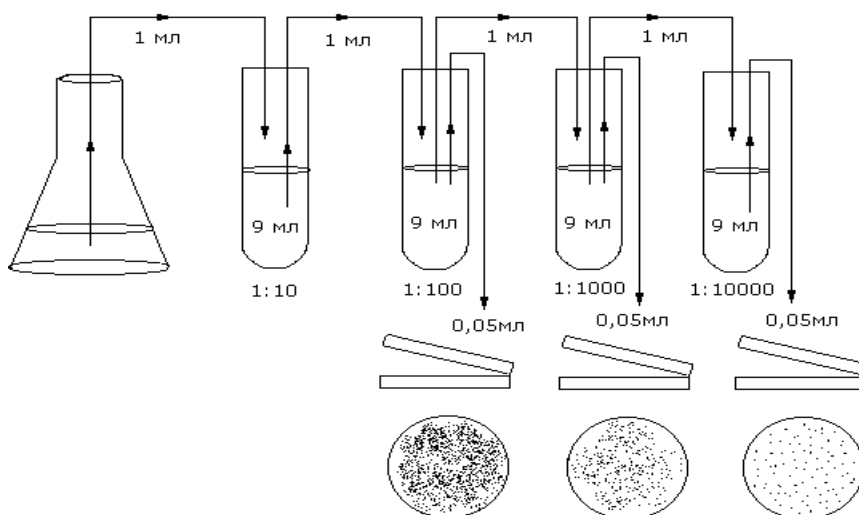


Рис. 6. Схема приготування та розсіву суспензії мікроорганізмів шпателем.

Чашки залишають на горизонтальній поверхні, поки середовище не застигне. Поверхню агаризованого середовища перед посівом рекомендується підсушувати для видалення конденсованої води. Середовище можна підсушити, помістивши чашки в термостат на 2–3 доби кришками вниз. Після того як середовище готове, на її поверхню стерильною піпеткою наносять точно виміряний обсяг (0,05 або 0,1 мл) відповідного розведення й розподіляють його стерильним скляним шпателем по поверхні середовища. Висіви на щільне середовище

проводять, як правило, із трьох останніх розведень, причому з кожного роблять 2-4 паралельних висівів. Посіви можна робити однією піпеткою, але при цьому починати треба обов'язково з більшого розведення. Для кожного розведення використовують новий стерильний шпатель. Після посіву чашки Петрі поміщають у термостат кришками вниз.

При глибинному посіві точно виміряний обсяг (як правило 0,1; 0,5 або 1,0 мл) вихідної суспензії або розведення вносять у розплавлене й охолоджене до 48-50°C агаризоване середовище, ретельно перемішують і потім негайно виливають у чашку Петрі. Середовищу дають застигти. У випадку глибинного посіву користуються середовищем, розлитим в пробірки. При більших масштабах роботи середовище по пробірках не розливають, а роблять наступним чином. По 1 мл з відповідного розведення переносять стерильною піпеткою в 2-4 стерильні чашки Петрі. Потім заливають чашки 15-20 мл розплавленим й охолодженим до 48-50°C щільним середовищем і ретельно змішують поживне середовище з посівним матеріалом легким обертовим рухом чашки по поверхні стола, після чого чашки залишають на горизонтальній поверхні до застигання. Коли середовище застигне, чашки Петрі в переверненому вигляді поміщають у термостат.

Для визначення кількості клітин анаеробних мікроорганізмів чашки Петрі із щільним середовищем після посіву поміщають в анаеростати. Іноді для визначення чисельності анаеробів щільне середовище після засіву залишають у пробірках. Поверхню застиглого середовища заливають парафіном. Для кращого розгляду колоній мікроорганізмів середовища в цьому випадку рекомендується освітлювати.

3. Підрахунок колоній, що вирости. Колонії мікроорганізмів залежно від швидкості росту підраховують через 2-15 доби інкубації. Підрахунок, як правило, проводять, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності кожну перелічену колонію відзначають крапкою на зовнішній стороні дна чашки. При великій кількості колоній дно чашки Петрі ділять на сектори, прораховують колонії в кожному секторі й підсумують результати. Іноді для підрахунку колоній використовують спеціальні напівавтоматичні лічильники.

Кращим розведенням варто вважати те, при висіві з якого в чашці Петрі виростає від 30-50 до 100-150 колоній. Якщо число виростих колоній виявилось менше 10, то ці результати для розрахунку кількості клітин у вихідному матеріалі не використовують. Результати паралельних висівів з того самого розведення підсумують і визначають середнє число колоній, що виростало при висіві з розведення на одній чашці.

Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату обчислюють за формулою:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

де: М – кількість клітин в 1 мл; а – середнє число колоній при висіві розведення, з якого зроблений висів; V – об'єм суспензії, узятий для посіву, у мл; 10^n – коефіцієнт розведень.

Матеріали, реактиви й устаткування:

Термостат, колби, пробірки, чашки Петрі, піпетки, шпателі Дригальського, пальники, поживні середовища, електропіч, досліджувальний матеріал.

Хід роботи:

У ході роботи необхідно визначити число клітин *Bifidobacterium bifidum* в біокефірі або біоїогурті.

1. Приготувати та простерилізувати лабораторний посуд.
2. Приготувати поживне середовище Блаурокка (середовище для культивування бактерій *Bifidobacterium bifidum*) та розлити по стерильним чашкам Петрі. Слід пам'ятати, що середовище Блаурокка рідке, тому в процесі варіння в нього необхідно додати агар-агар для застигання.
3. Приготувати серію розведень.
4. Провести посів розведень мікробної культури на чашки.
5. Через добу провести підрахунок колоній, знайти середнє значення.
6. Розрахувати кількість клітин за формулою.
7. Зробити висновки та оформити роботу.

Контрольні питання

1. Що таке КУО?
2. Для чого використовують розведення культури мікроорганізмів.
3. За якою формулою розраховують кількість клітин?
4. Що таке біокефір.
5. Підбір складу поживного середовища, розробка технологічних етапів культивування залежно від механізмів регуляції метаболічних шляхів та фізіологічних особливостей клітин промислового штаму.

Лабораторна робота № 7

Тема. Визначення біомаси культури клітин шляхом зважування

Мета: Вивчення методики визначення біомаси мікроорганізмів ваговим методом.

Завдання: Провести змиви культури мікроорганізмів із поверхні щільного поживного середовища чашок Петрі, відфільтрувати та визначити масу культури ваговим методом.

Теоретичні основи

Цей метод широко застосовують для оцінки росту мікроорганізмів у рідких поживних середовищах. Його можна використовувати й для визначення маси клітин, вирощених на щільному поживному середовищі однак у цьому випадку мікроорганізми необхідно попередньо ретельно змити з поверхні середовища фізіологічним розчином або водою й перевести в суспензію. Метод не може бути використаний при культивуванні мікроорганізмів на середовищах, до складу яких входять сполуки не розчинні у воді.

Визначення біомаси складається із трьох послідовних операцій: доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення, відділення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини, визначення їх маси. Найчастіше визначають масу сухих клітин, хоча іноді можна обмежитися визначенням сирої біомаси. В останньому випадку перший етап відпадає; досить тільки зважити центрифужну пробірку (фільтрат), але не доводити її масу до постійного значення. Біомасу виражають у грамах або міліграмах на літр культуральної рідини.

Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення. Із цією метою фільтри, попередньо покладені у відкриту чашку Петрі, або центрифужні пробірки поміщають у сушильну шафу й висушують упродовж 1–2 год при температурі 80–85° й 90–100°C відповідно. Потім чашку Петрі з фільтрами або центрифужні пробірки виймають із сушильної шафи й переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl_2) або концентрованою сірчаною кислотою. Ексикатор ставлять біля аналітичних ваг, на яких буде проводитися зважування. Через годину фільтри (центрифужні пробірки) зважують із точністю до 0,0001 г. Висушування й зважування повторюють, дотримуючи зазначеної послідовності операцій, доки маса не досягне

постійного значення, тобто коливання в її значеннях не перевищать $\pm 0,0001$ г.

Відділення мікроорганізмів від середовища можливо центрифугуванням або фільтруванням. Центрифугуванням відокремлюють зазвичай бактерії. Для цього в центрифужну пробірку наливають точно виміряний об'єм ретельно перемішаної рідкої культури, що залежно від її щільності коливається від 5 до 20 мл. Час центрифугування й число оборотів залежать від розмірів клітин. Чим вони менше, тим більше потрібно оборотів і тем тривалішим повинен бути час центрифугування. Найчастіше центрифугують 15–20 хв при 5–10 тис. оборотів за хв. Після центрифугування надосадову рідину обережно зливають, осад промивають злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на 1 л води) і знову центрифугують при тім же числі оборотів. Супернатант зливають негайно після зупинки центрифуги. У протилежному випадку частина осаду може бути загублена.

Міцелій актиноміцетів і грибів відокремлюють фільтруванням. Паперовий фільтр поміщають у скляну лійку й фільтрують через нього точно виміряний обсяг культури, від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою.

Для відділення бактерій використовують мембранні фільтри. Розміри пор мембранного фільтра повинні бути менше величини клітин, біомасу яких визначають. Мембранний фільтр поміщають на пористу пластинку спеціального вмонтовану в колбу. Щоб прискорити фільтрування, колбу підключають до водострумного насоса. Осад кілька разів промивають підкисленою дистильованою водою.

Визначення біомаси. Щоб визначити масу сухих клітин, центрифужну пробірку або фільтр із осадом клітин мікроорганізмів поміщають у сушильну шафу, висушують і зважують. Режим висушування й зважування той же, що використовується й при визначенні маси пробірок або фільтрів. Суху біомасу визначають за формулою:

$$M = \frac{(A-B)1000}{V},$$

де: М – суха біомаса в г/л;

А – маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом у г;

В – маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду в г;

V – обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) у мл.

Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища й старанністю зважування.

Матеріали, реактиви й устаткування:

Чашки Петрі з культурою мікроорганізмів, культуральна рідина з невідомою концентрацією мікроорганізмів, фільтри, центрифужні пробірки, чашки Петрі, центрифуга, аналітичні ваги, сушильна шафа, ексікатор.

Хід роботи:

1. Довести масу центрифужних пробірок та фільтрів до постійної.
2. З поверхні щільного поживного середовища чашок Петрі провести змив культури мікроорганізмів великою кількістю дистильованої води. Далі провести фільтрування через паперовий фільтр. Потім фільтр кладуть у сушильну шафу і доводять його масу до постійної. Масу культури визначають за формулою.
3. Із колби в центрифужну пробірку наливають точно виміряний ретельно перемішаної рідкої культури в об'ємі 5 мл. Проводять центрифугування при 3000 об/хв. упродовж 25 хв. Далі надосадову рідину зливають. Осад промивають підкисленою водою і пробірки знову ставлять на центригування. Потім масу пробірки доводять до постійної. Масу культури визначають за формулою.
4. Зробити висновки та оформити роботу.

Контрольні питання

1. Методика визначення біомаси ваговим методом.
2. Яким ще способом можна визначити біомасу в культуральній рідині?
4. В яких одиницях вимірюється кількість біомаси в культуральній рідині?
5. Базові кінетичні показники періодичного культивування.
6. Кінетика утилізації субстрату та утворення метаболітів в періодичному режимі культивування.
7. Питома швидкість росту, економічні коефіцієнти, вихід біомаси, ступінь використання субстрату, продуктивність біосинтезу, фізіологічна цінність субстрату.
8. Математичне моделювання ростових процесів.

Лабораторна робота №8

Тема. Отримання засівного матеріалу для поверхневого і глибинного культивування промислових мікроорганізмів.

Мета: Вивчити способи отримання засівного матеріалу мікроорганізмів, які використовуються в біотехнологічних процесах у промислових масштабах.

Завдання: Отримати засівний матеріал промислових мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*.

Теоретичні основи

Будь-який біотехнологічний процес починається з підготовки біооб'єкта. Біооб'єкт або промисловий штам повинен задовольняти наступним основним вимогам:

- стабільність структурно-морфологічних ознак та фізіологічної активності при тривалих зберіганнях і експлуатації у виробництві;
- підвищені швидкості росту та біосинтезу цільового (-их) продукту (-ів) у лабораторних та виробничих умовах;
- достатньо широкий діапазон стійкості до дії несприятливих зовнішніх чинників (коливання температури, рН, аерація, перемішування, в'язкість середовища);
- помірна вимогливість до обмеженого числа джерел живлення; чим ширший набір джерел Карбону, Нітрогену та інших елементів може використовувати виробничий штам, тим легше його культивувати з більшою економічною вигодою.

Насправді кожен штам має свої особливості і не за всіма показниками відповідає вимогам, що висуваються для промислових робочих штамів. Штами промислових мікроорганізмів на біотехнологічні виробництва надходять, в основному, в ампулах або у флаконах, де вони законсервовані у вигляді чистих культур. Штами міцеліальних грибів – на агаризованому поживному середовищі в мікробіологічних пробірках (під шаром мінеральної олії або без неї).

Кожна культура має паспорт з описом поживного середовища, морфологічних, фізіологічних та інших характеристик, умов для їх підтримки, вирощування і терміну зберігання. Режим зберігання культур припускає охолодження, заморожування або зневоднення; у всіх випадках повинен бути різко скорочений або повністю припинений клітинний обмін речовин.

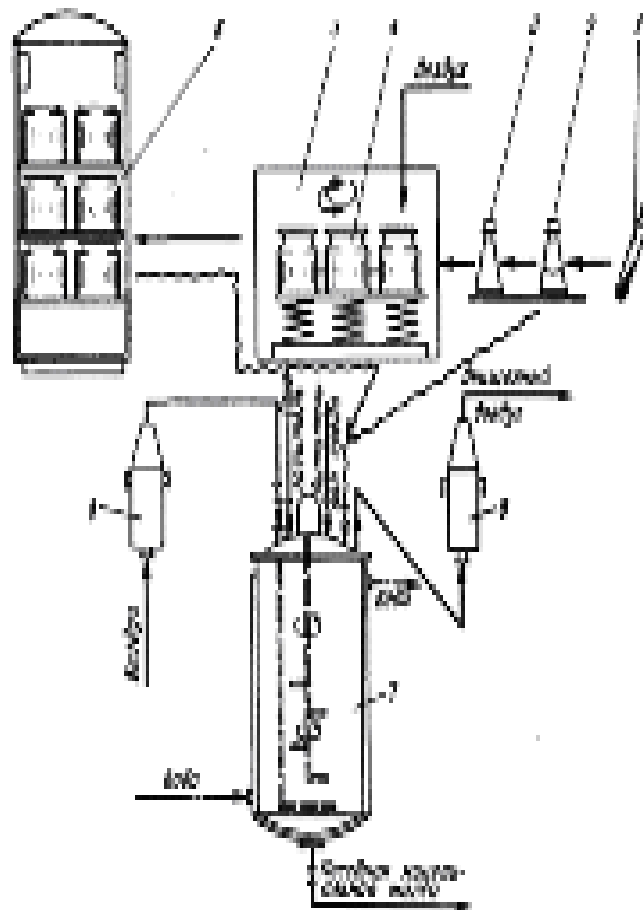


Рис. 7. Технологічна схема отримання засівної культури глибинним способом культивування (міцеліальний продуцент) (Грачева І.М., 1987):

1 – вихідна культура продуцента в пробірках; 2 – культура в колбі на сушловому середовищі; 3 – культура на висівках у колбі; 4 – ємність для отримання глибинної культури; 5 – качалка; 6 – холодна кімната; 7 – інокулятор; 8 – фільтри для очищення повітря.

Культури мікроорганізмів зберігають:

- на косому агарі за температури мінус 1–5°C або плюс 1–5°C;
- замороженими за температури нижче мінус 20°C (неприпустимо повторне відтавання і заморожування);
- ліофілізованими в ампулах, що зберігаються впродовж декількох років.

Більшість культур клітин ссавців, у тому числі й клітин людини, вдається зберігати невизначено довгий час замороженими в спеціальному середовищі за температури мінус 180°C. Через певний час, специфічний, для кожного виду мікроорганізмів та способу зберігання, культуру пересівають.

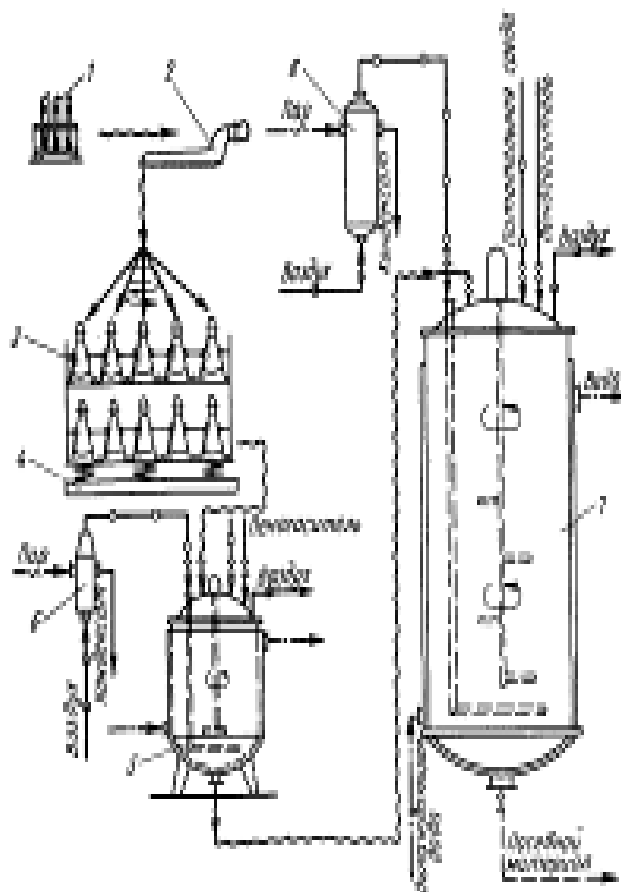


Рис. 8. Технологічна схема отримання засівної культури глибинним способом культивування (бактерійний продуцент) (Грачева І.М., 1987):

1 – пробірки із продуцентом; 2 – матраци із агаризованим середовищем; 3 – колби для засіву; 4 – качалка для колб; 5 – малий інокулятор; 6 – фільтр; 7 – великий інокулятор

Перед початком технологічного процесу культуру, що зберігається в умовах, близьких до анабіозу, оживляють додаванням стерильного рідкого поживного середовища з подальшим висівом на тверде поживне середовище. Переконавшись у чистоті культури, її розмножують у стерильних умовах за оптимального складу поживного середовища та режиму вирощування, методом проліферації. Для цього поступово збільшують об'єм культури, поступово збільшуючи об'єм поживного середовища. У промисловості засівний матеріал, зазвичай, отримують глибинним способом у спеціальних апаратах – інокуляторах

Засівний матеріал повинен володіти:

- високою життєздатністю;
- бути абсолютно стерильним;
- володіти високою біохімічною активністю.

Засівну культуру продуценту отримують глибинним та поверхневим способами (рис. 7–9). Під час виробництва пробіотику “Біоспорин” (продуцент *Bacillus subtilis*), цитринової кислоти (продуцент *Aspergillus niger*), вирощування їстівних грибів тощо. Засівний матеріал одержують не глибинним способом на рідких поживних середовищах, а поверхневим способом.

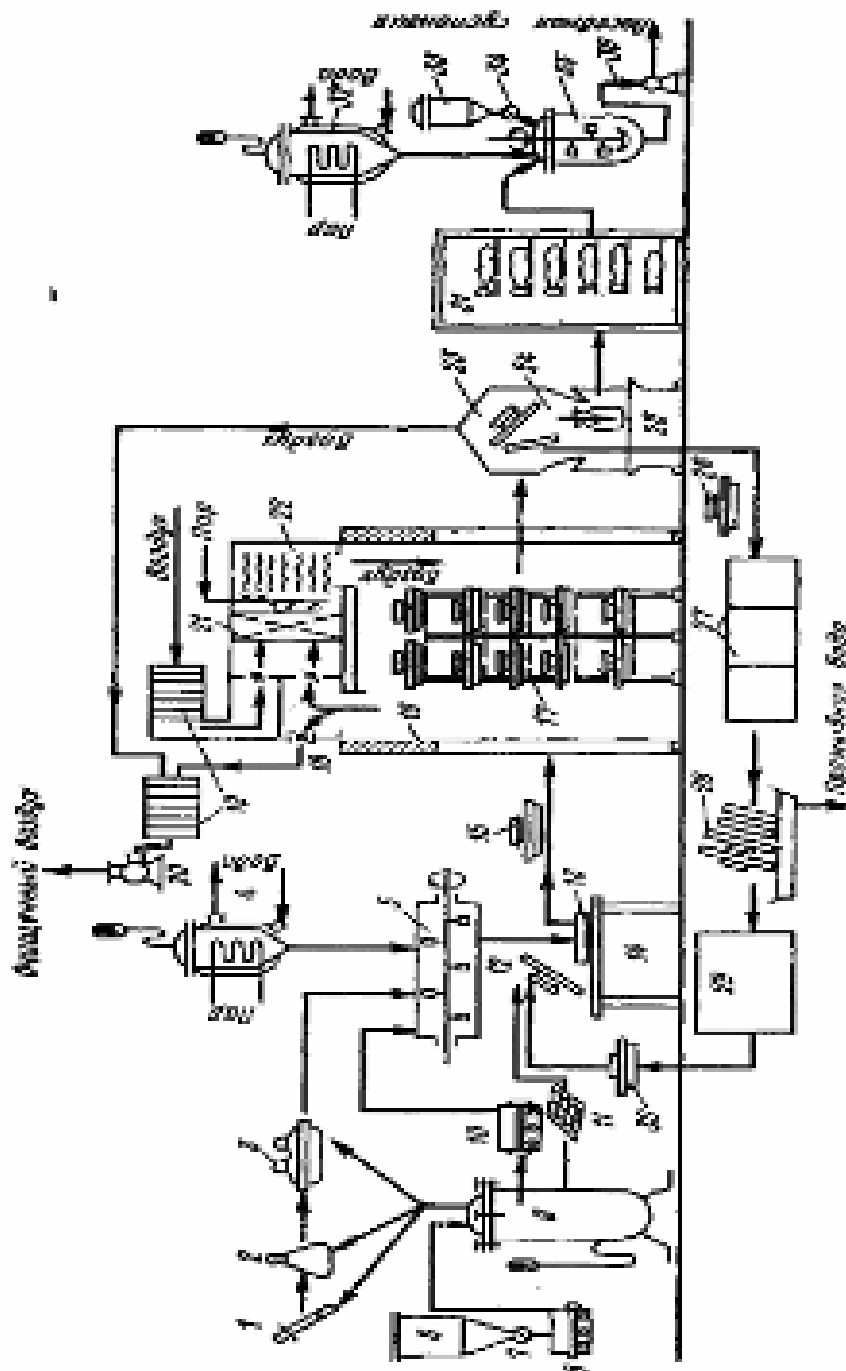


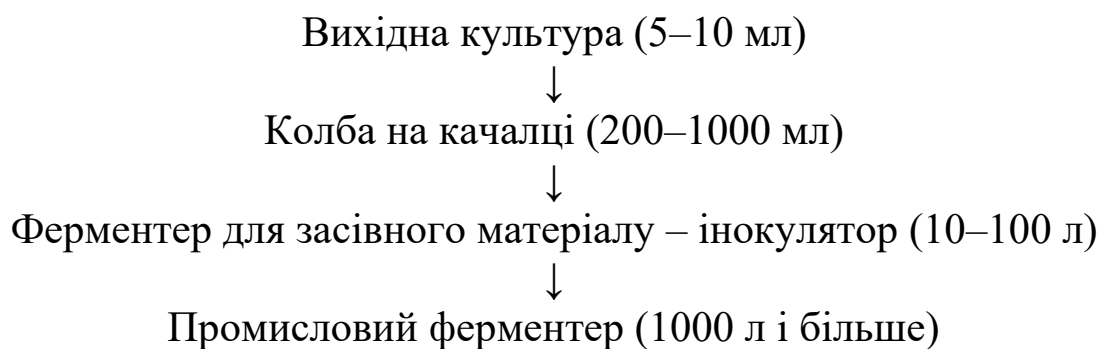
Рис. 9. Технологічна схема отримання засівної культури поверхневим способом культивування (Грачева І.М., 1987):

1 – вихідна культура продуцента у пробірках; 2 – культура у колбі на висівках; 3 – культура на висівках у банці; 4 – ємність для підігрівання води; 5 – стерилізатор; 6 – ємність для зберігання висівок; 7 – дозатор; 8 – бокс із висівками; 9 – автоклав; 10 – бокс із стерильними висівками; 11 – ватно-марлева салфетка; 12 – кришка для кювети; 13 – кювета на завантаженні; 14 – стіл; 15 – заповнена кювета; 16 – камера для вирощування; 17 – стелажі; 18 – викидання повітря із калориферу до атмосфери; 19 – фільтри для повітря; 20 – вентилятор; 21 – калорифер; 22 – відбійники; 23 – ручний маніпулятор для завантаження кювет; 24 – готова засівна культура; 25 – стерильний флакон; 26 – забруднена кювета; 27 – ванна для миття кювет; 28 – сушка кювет; 29 – шухляда для стерилізації кювет; 30 – стерильна кювета; 31 – холодна кімната; 32 – ємність для стерилізації та охолодження води; 33 – ємність для поверхово-активної речовини; 34 – дозатор; 35 – ємність для приготування засівної суспензії; 36 – насос.

На рис. 9 зображена схема отримання засівної культури мікроорганізмів – продуцентів біологічно-активних речовин (ферментів, органічних кислот, антибіотиків, пробіотиків тощо). Отримання засівної виробничої культури проводиться у декілька етапів:

- 1) оновлення початкової культури на агаризованому середовищі;
- 2) отримання маточної культури;
- 3) отримання засівної культури (рис.10).

Загальна схема отримання промислового засівного матеріалу глибинним способом наступна (див. рис. 7, 8):



Під час глибинного культивування (див. рис. 8) початковий продуцент з пробірки 1 пересівають на матраци 2 з великою кількістю агаризованого середовища. З матраців культуру змивають стерильною водою та у вигляді суспензії використовують для засіву колб 3. Частіше засів роблять відразу з пробірки у колби. Колби закріплюють на гойдалці 4, яка струшує рідину у колбах і сприяє розчиненню кисню в середовищі, що забезпечує нормальні умови життєдіяльності мікроорганізмів. Готову культуру з колб збирають в одну ємність при дотриманні правил асептики та переносять в малий інокулятор 5 із стерильним охолодженим

середовищем. Засів проводять у полум'ї факела, через засівний патрубок інокулятора.

У малий інокулятор через індивідуальний фільтр 6 подається стерильне повітря. Підготовку, стерилізацію та охолодження поживного середовища проводять у малому інокуляторі. Піногасник стерилізують та охолоджують у спеціальній ємності і подають у малий інокулятор за потребою. Для великого інокулятора 7 середовище готують, як правило, в спеціальних апаратах, потім його стерилізують, охолоджують приблизно до 30–40°C і подають у стерильний охолоджений до 60–70°C великий інокулятор, вирівнюють температуру середовища до оптимальної для вирощуваного продукту.

Після цієї операції готову культуру з малого інокулятора передавлюють стерильним повітрям у великий інокулятор на свіже поживне середовище. Культивування на всіх стадіях ведеться за оптимальної температури та аеруванні. Міцеліальні гриби вирощують для отримання корового білка та як джерело біологічно-активних речовин: ферменти, амінокислоти, органічні кислоти, антибіотики тощо. Мікроскопічний гриб *Aspergillus niger* є продуцентом цитринової кислоти, а вищий їстівний гриб *Pleurotus ostreatus* є джерелом екологічно чистого білка харчового та кормового призначення.

Одержання засівної культури міцелію вищого їстівного грибу *Pleurotus ostreatus* поверхневим способом (рис. 9). Зазвичай, для отримання засівної культури міцелію застосовують зерно злакових культур. Зерно миють, варять, підсушують і вносять мінеральні добавки для регулювання рН. Підготовлене зерно засипають на 2/3 у ємності, зазвичай це 1-3-літрові банки, які закривають та стерилізують автоклавуванням (1,5 години за 1,0-1,5 атм. та 120°C).

Стерильне зерно охолоджують і засівають чистою культурою міцелію (одержану з музейних культур) з пробірок, що знаходиться на агаризованому середовищі. Засіяні банки з міцелієм витримують в інкубаційній камері (22-25°C у приміщенні, вологість повітря 60%). За 3–4 тижні субстрат заростає білим пухким міцелієм. Зрілий засівний міцелій готовий до інокуляції підготовлених субстратних блоків. Засівний міцелій може зберігатися за низьких температур (2-5°C) або у замороженому стані із застосуванням рідкого азоту (до мінус 196°C). Далі засівний міцелій вносять у твердий субстрат (соняшникове лушпиння, солома та інші) для поверхневого вирощування у мішках. Гливу вирощують для отримання їстівних плодових тіл.

Одержання засівної культури міцелію мікроскопічного гриба *Aspergillus niger* поверхневим способом (Грачева, 1982)

Оновлення культури. Музейну культуру з колекційної пробірки пересівають у біологічні пробірки (діаметр 18 мм) із свіжим поживним середовищем “сусло-агар” (5–6% пивне сусло та 1,5–2% агару). Засіяні пробірки витримують у термостаті за 30°C упродовж 3–4 діб. Ріст гриба закінчується інтенсивним спороутворенням.

Отримання засівної культури. У конічні колби об’ємом 250 см³ поміщають 15–20 г. пшеничних висівок із вологістю 45%, закривають ватяними пробками та папером. Колби із висівками автоклавують 1 годину за 120°C. Після охолодження висівок до 30–40°C у колбах після автоклавовання їх засівають у стерильних умовах суспензією спор мікроскопічного гриба. Суспензію отримують змиванням стерильною водою (1 см³ на одну засієну пробірку) спор із косяка з оновленою культурою. Засіяні колби ставлять до термостату на 2–3 доби за 30°C. За цей час міцелій гриба щільно пронизує субстрат із конідіями жовто-зеленого забарвлення. Даний матеріал є засівною культурою для подальшої пересадки на тверде поживне середовище у кювети для вирощування поверхневим способом.

Із спор гриба, ліофілізовано висушених, готують суспензію: 3 г сухих спор замочують у 2–3 дм³ мелясним розчином (відходи цукрового виробництва) і витримують за 32°C у термостаті впродовж 5–6 годин (оновлення культури). Отриману суспензію засівають у посівний ферментер (малий інокулятор) із аерацією та перемішуванням. Постійно темпорально проводять аналіз на стерильність. Міцелій спливає на поверхню, знизу залишається прозорий розчин. Міцелій пластівцеподібний, дифузний із світлими тонкими гіфами є засівною культурою і придатний до подальшого засівання у промисловий ферментер.

Одержання засівної культури міцелію мікроскопічного гриба *Aspergillus niger* глибинним способом (Фараджєва, 2002)

Матеріали, реактиви та обладнання:

Чисті культури *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, середовище Сабуро, МПА, сусло-агар, фізіологічний розчин, стерильна вода, стерильний посуд (піпетки, чашки Петрі, пробірки), бактеріологічна петля, тонкі предметні скельця, покривні скельця, спиртівка (брикети сухого пального), кювета з містком для фіксованих препаратів, розчини фарбників, імерсійне масло, бензин, серветки, фільтрувальний папір, дезінфікуючий розчин, дистильована вода.

Порядок виконання роботи:

1. Ознайомитися з промисловими музейними штамми мікроорганізмів і з паспортами до них.



Рис. 10. Блок-схема одержання засівної культури міцелію гливи звичайної, поверхневим способом

2. Зарисувати форми зберігання промислових мікроорганізмів: *Pleurotus ostreatus*, *Bacillus subtilis*, *Blakeslea trispora* та ін., вказати способи їх зберігання.

3. Зобразити блок-схеми отримання засівного матеріалу продуцентів БАР: вищого їстівного гриба *Pleurotus ostreatus* та мікроскопічного гриба *Aspergillus niger* поверхневим способом.

4. Розглянути та зарисувати апаратурно-технологічні схеми одержання засівного матеріалу промислових продуцентів глибинним та поверхневим способами.

5. Перевірити якість робочої культури *Saccharomyces cerevisiae*, що виросла на агаризованому поживному середовищі у пробірках. Визначити морфологію клітин, відсотковий вміст мертвих клітин.

6. Провести посів на рідке поживне середовище в коливальні колби.

7. Результати оформити. Зробити висновки.

Контрольні питання:

1. Чиста культура – це...?

2. Накопичувальна культура – це...?

3. Наведіть способи одержання засівної культури продуцентів БАР.

4. Наведіть технологічні стадії одержання засівної культури промислового продуцента.

5. У якому вигляді і за яких умов зберігаються промислові культури продуцентів?

6. Які вимоги висуваються до промислових штамів у біотехнологічному виробництві?

7. Які вимоги висуваються до промислової засівної культури у біотехнологічному виробництві?

8. У яких апаратах відбувається процес одержання засівної культури?

9. Як називається метод поступового нарощування об'ємів засівної культури?

10. Наведіть особливості мікроорганізмів, які сприяють широкому застосуванню мікроорганізмів як біооб'єктів у промисловості для одержання багатьох біотехнологічних продуктів?

11. Що передбачає стадія підготовки біооб'єкта?

Лабораторна робота №9

Тема. Поверхневе та глибоке культивування промислових мікроорганізмів.

Мета: Вивчення способів культивування мікроорганізмів. Здійснення поверхневого та глибокого культивування.

Завдання: Засіяти поживне середовище чистою культурою промислового мікроорганізму та здійснити культивування. Вивчити морфологію мікроорганізмів та порівняти способи вирощування.

Теоретичні основи

Культивування мікроорганізмів у промисловості здійснюють поверхневим або глибоким способами. Поверхневим способом вирощують тільки аеробні мікроорганізми на поверхні твердого або сипучого поживного середовища. Глибоким методом вирощують мікроорганізми в рідкому поживному середовищі, цей метод застосовується як для вирощування аеробних, так й анаеробних мікроорганізмів.

Поверхневе культивування мікроорганізмів

Процес культивування продуцента починається з моменту засіву охолодженого стерильного живильного середовища посівним матеріалом. Засів середовища при періодичній стерилізації зазвичай проводиться безпосередньо в стерилізаторі в охолоджене середовище при постійному перемішуванні. При безперервній стерилізації середовище засівають у відсіку стерилізатора, де воно охолоджується, потім засіяне середовище передають у цех вирощування.

Поверхневе культивування мікроорганізмів може проводитися різними способами. Традиційним є кюветний спосіб, який, на жаль, вимагає застосування важкої ручної праці та величезних виробничих площ. Новішим методом є вирощування продуцентів у механізованих установках.

Кюветний спосіб вирощування. Елементарним місцем для вирощування є кювета – ємність чотирикутної форми площею 0,25–0,50 м² і висотою 2–50 мм. Вона виготовляється з листа металу з перфорованим дном і рідше – з суцільного листа. Кювети бувають відкриті і з кришками. Найбільшого поширення набули відкриті кювети з оцинкованого заліза з перфорованим дном. Перфорація виконується у вигляді довгастих вузьких щілин завдовжки 20 мм та шириною 1,5–2,0

мм, розташованих або в шаховому порядку, або підряд із зазором між отворами 3–5 мм і відстанню між рядами 10 мм.

Стерильні кювети заповнюють зволуженим та засіяним продуцентом поживним середовищем шаром 2,0–2,5 см і транспортують у зрошувальні камери, де кювети розташовуються на багатоярусних рухомих етажерках або стаціонарних стелажах з відстанню між ярусами 10–11 см. Зазвичай у стелажах і етажерках влаштовано 17–18 ярусів при загальній висоті не більше 2 м. Це пов'язане з тим, що кювети з середовищем завантажуються на стелажі в ручну робітником, що стоїть на підлозі. Перша кювета встановлюється на висоті 20–25 см від підлоги. Етажерки та стелажі повинні виконуватися з металу з антикорозійним покриттям.

Перед завантаженням кювет камеру миють і дезінфікують формаліном, який потім видаляється з камери при аерації та обробці амоніаком. Камери бувають різного типу і форми. Вони можуть використовуватися з максимальним заповненням простору та мати висоту 2,2 м, або з вільнішим заповненням, коли висота стель може бути 3,0 м та більше. Камера може заповнюватися кюветами суцільно, наприклад, на пересувних стелажах-етажерках або кювети можуть розташовуватися на стаціонарних стелажах, коли між стелажми передбачається вільний прохід. Найчастіше камера має форму довгого вузького коридору з дверима в торцях. Безпосередньо над камерою розташовується відділення кондиціонування та очищення повітря.

Камери всіх типів працюють за наступним графіком: завантаження; культивування (зазвичай складає від 20 до 72 год); підсушування культури на кюветах сухим, підігрітим до 40–45°C повітрям упродовж 3–4 год; вивантаження; прибирання а миття камери; обробка формаліном, амоніаком та парою (3 год) і провітрювання камери (близько 3 год). Повний технологічний цикл у камері з урахуванням тривалості росту продуцента зазвичай складає від 36 до 90 год і залежить від виду продуцента.

Зрошувальні камери розташовують так, щоб у них можна було вести вирощування культури з дотриманням всіх правил асептики. Кожна камера має два виходи. З одного боку камера сполучена із стерильним коридором, з якого в камери завантажують кювети з тільки що засіяним середовищем, а з іншою примикає до розвантажувального коридора, по якому з камер транспортують кювети з готовою культурою. Використання кювет у виробництві пов'язане з витратою великої кількості ручної праці, оскільки майже всі операції на стадії культивування виконуються вручну. І хоча отримання культури

продуцента технологічно порівняно просте, її собівартість достатньо висока.

Вирощування в механізованих установках. Основна складність при створенні механізованих ліній полягає в тому, що шар поживного середовища повинен добре аеруватися, не спресовуватися і не підсушуватися. Механізована установка повинна бути влаштована так, щоб можна було без зупинки лінії у разі виникнення інфекції провести стерилізацію і негайне вивантаження зараженого середовища. Механізовані установки розробляються і реалізуються на практиці у ряді країн світу: США, Японії, Франції, Чехії, Німеччина, Росії, країнах СНД тощо.

Найбільш відомими є механізовані установки Андеркофлера, Джеффріса і Хрістенсена. В установці Джеффріса здійснюється механізоване завантаження засіяного середовища в кювети, які переміщаються по транспортеру і за допомогою спеціального пристрою передаються на підвісну етажерку. Завантажена етажерка по монорельсі входить у зрошувальний коридор, де створюються необхідні умови, і з швидкістю, залежно від тривалості культивування продуцента, переміщається до іншого кінця коридора. Готова культура при виході із зрошувального коридора автоматично розвантажується, після чого цикл повторюється.

В установці Хрістенсена процес вирощування здійснюється на безперервно рухомій стрічці скребкового транспортера і процес накопичення ферментів у культурі завершується у зрошувальній камері барабанного типу. Продуктивність цих установок – 1,6 т/добу. Але ці установки мають істотний недолік: у разі інфікування необхідні повна зупинка процесу та стерилізація всієї лінії. Механізована установка Андеркофлера періодичної дії має продуктивність – до 10 т/добу.

Достатньо надійною є механізована установка, яка використовується в Чехії для вирощування поверхневої культури продуктивністю 0,4 т/добу. Ця установка є камерою, в якій розміщений багатоярусний ланцюговий транспортер з підвішеними до нього лотками. В процесі руху транспортера лотки заповнюються до тих пір, поки перший заповнений лоток не дійде до останньої позиції нижньої стрічки транспортера. Потім камера підключається до кондиціонера, рух транспортера припиняється до кінця культивування. Коли ріст закінчений, включають транспортер, лотки по черзі перекидаються, культура потрапляє в бункер. Після розвантаження камера та лотки миються, стерилізуються, цикл

повторюється. Ця установка має невелику продуктивність, але дуже надійна в експлуатації.

У наш час реальною установкою, здатною працювати в умовах виробництва, є механізована лінія з вертикально розташованими кюветами, створена у ВНДІФС і ВНДІ біотехніка за ідеєю А.В. Соловйова.

Принципова схема установки продуктивністю 1,5 т/добу для вирощування культури у вертикальних кюветах дана на рис. 11а. Простерилізовані засіяні висівки за допомогою спеціального розподільного пристрою завантажуються на вібраційному столі в зрошувальну камеру і по рейковому шляху подаються в зрошувальне відділення. На спеціальних візках траверсів зрошувальні камери підводяться до повітряних дифузорів.

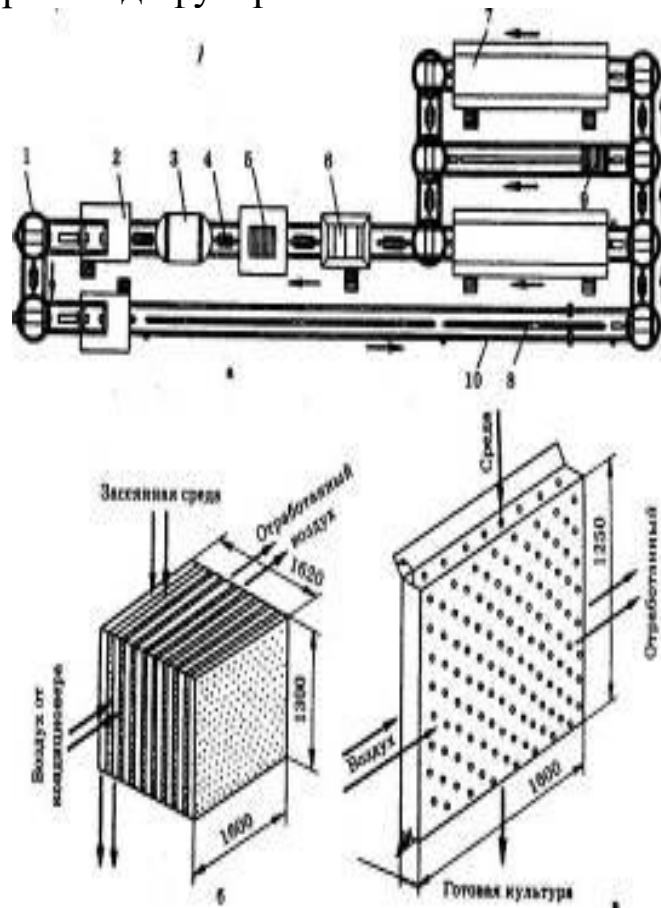


Рис. 11. Установка з вертикальними кюветами для вирощування поверхневої культури:

а – загальна схема: 1 – поворотне коло; 2 – вібраційний стіл для завантаження; 3 – стерилізатор камер; 4 – штовхач; 5 – пристрій для миття камер; 6 – стіл для розвантаження; 7 – коридор з кондиціонерами для вирощування; 8 – транспортер; 9 – зрошувальна камера; 10 – рейковий шлях; б – зрошувальна камера; в – кювета.

Останні підключені до кондиціонерів, які можуть подавати повітря до зростаючої культури по різних режимах залежно від фази росту культури. Аерація культури здійснюється через вертикальні канали, що знаходяться між кюветами, через перфоровані стінки кювет. Повітря переміщується уздовж кювет. Кондиціонери працюють з рециркуляцією повітря, підсос свіжого повітря складає 10%. Викид в атмосферу відпрацьованого повітря також 10%. Відпрацьоване повітря перед видаленням очищається від мікрофлори і пилу. Культура в зрошувальній камері практично не підсихає, навіть спостерігається її додаткове зволоження вологою, що виділяється мікроорганізмами в процесі росту. Схематично зрошувальна камера є ящиком прямокутної форми з алюмінієвого сплаву (рис.11б). Перфоровані перегородки з круглими отворами діаметром 3 мм і кроком 40 мм утворюють усередині ящика вертикальні кювети. Просвіти між кюветами виконують роль повітряних щілинних каналів. Кювети можуть відкриватися знизу і зверху (рис. 11.в).

Звільнена від культури зрошувальна камера по рейковому шляху подається в мийну камеру, забезпечену форсунками, що подають потужні струмені води. Зрошувальна камера миється, а потім стерилізується в спеціальній стерилізаційній камері. Чиста простерилізована зрошувальна камера подається в стерилізаційне відділення на вібраційний завантажувальний стіл, а потім цикл повторюється. Місткість кожної камери складає 500 кг за сухими висівками.

Переваги цієї установки полягають у повній механізації процесу вирощування в ізолюванні зрошувальних камер, що у разі потреби дозволяє ізолювати осередок інфекції та провести повну послідовну стерилізацію всіх камер, чого не можна зробити в установках, які безперервно діють. Представляє практичний інтерес установка колонного типу конструкції ВНДІ біотехніка, призначена для вирощування мікроскопічних грибів у товстому шарі (рис. 12).

Складність вирощування в товстому шарі пов'язана з тим, що відбувається перегрів внутрішніх шарів у результаті інтенсивного тепловиділення, що призводить до ускладнення аерації. При вирощуванні культур у закритому герметичному апараті рух газу відбувається не уздовж поверхні шару середовища, а розповсюджується на весь об'єм. Виникає режим об'ємної аерації, здатний забезпечити конвективний і дифузійний тепломасообмін по всій висоті шару ростучої культури, що дозволяє в 10 і більше разів збільшувати висоту шаруючого середовища (до 300 мм).

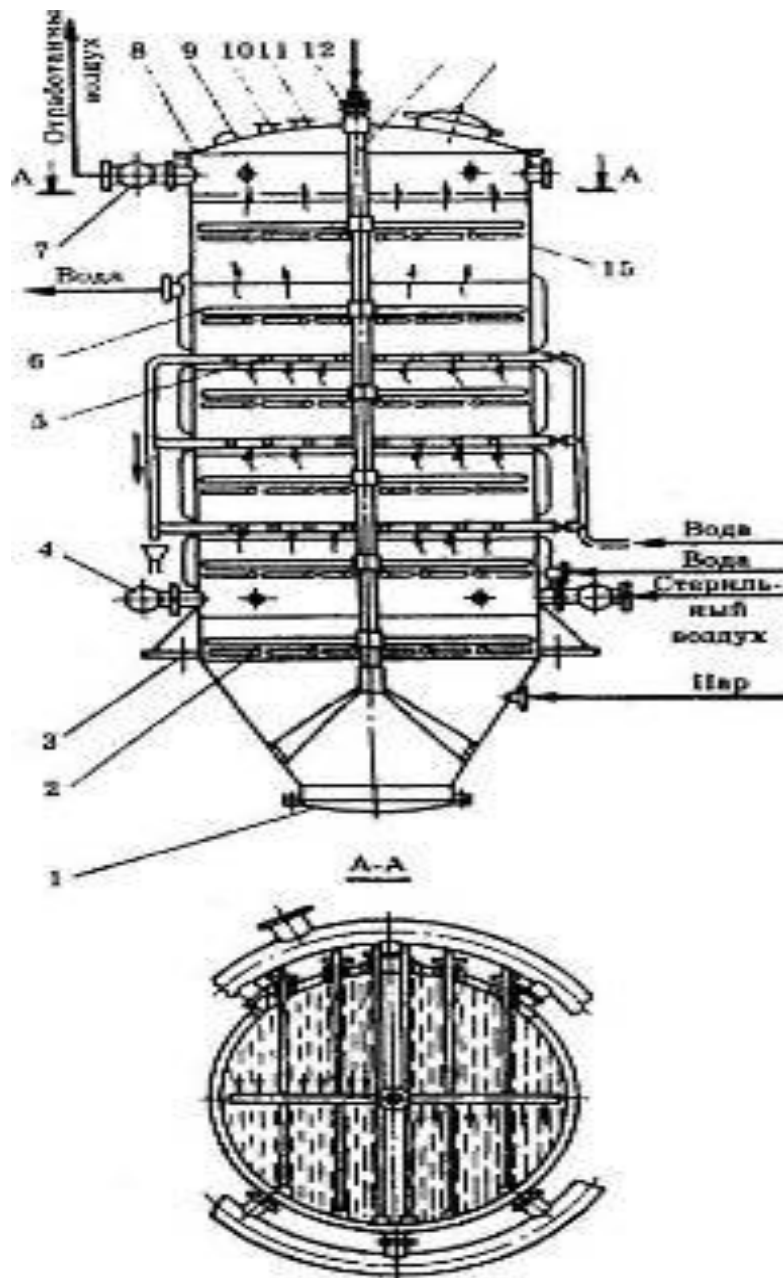


Рис. 12. Апарат для механізованого вирощування мікроорганізмів у товстому шарі середовища:

1 – люк для вивантаження; 2 – вал секції; 3 – опора; 4 – колектор підведення стерильного повітря; 5 – змійовики, що охолоджують; 6 – лопать валу; 7 – колектор відведення відпрацьованого повітря; 8 – кришка; 9 – бобишка манометра; 10 – штуцер; 11 – повітряний клапан; 12 – шестерня приводу вала; 13 – вал; 14 – люк для завантаження; 15 – корпус.

Апаратом є вертикальний циліндр, розділений на секції перфорованими пластинами, укріпленими консольно на поворотних осях. У середині апарата розташовані перемішуючі пристрої для періодичного перемішування, що забезпечують рівномірність висоти шару та виключають утворення застійних зон середовища усередині кожної

секції. Таким чином, в шарі підтримується задане розподілення повітря. Верхня частина апарата герметично сполучена із стерилізатором. Стерильне повітря для аерації надходить у кожен шар під перфоровані пластини із заданою температурою та об'ємом і перед виходом в атмосферу піддається бактеріальному очищенню.

Глибинне культивування мікроорганізмів. Цей спосіб має ряд очевидних переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити важку непродуктивну ручну працю, поліпшити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, робить можливим перехід на безперервний спосіб культивування.

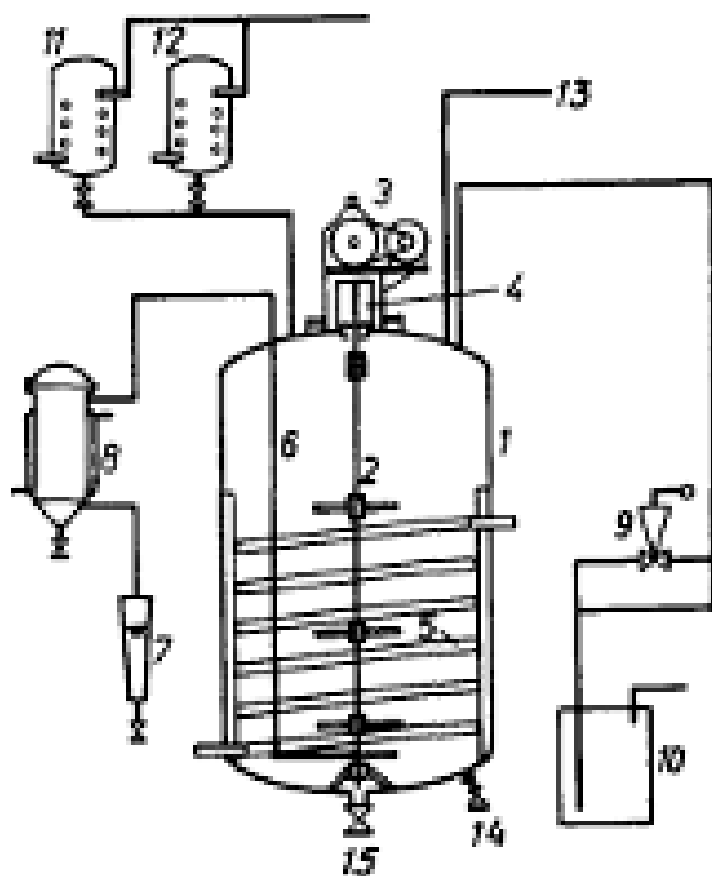


Рис. 9.3. Схема ферментера із допоміжними пристроями (Беккер, 1974):

1 – корпус ферментера; 2 – вал змішувача із турбінами; 3 – електродвигун із коробкою передач; 4 – сальник вала змішувача; 5 – спіраль теплообмінника; 6 – перфорований барботер; 7 – пристрій для визначення витрати повітря; 8 – фільтр для стерилізації повітря; 9 – повітряний клапан із вентилем регулювання; 10 – уловлювач, наповнений фенолом; 11, 12 – резервуари для стерилізації піногасника та додаткової подачі живильного середовища під час ферментації; 13 – трубопровід для живильного середовища; 14 – вентиль виводу; 15 – вентиль для відбору проб.

При глибинному способі культивування раціональніше використовуються живильні речовини середовищ, що дають можливість значно скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого живильного середовища, отримувати препарати з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю. Глибинне культивування проводять у вертикальних герметичних ємностях різного розміру, що називаються ферментаторами (рис. 13, 14).

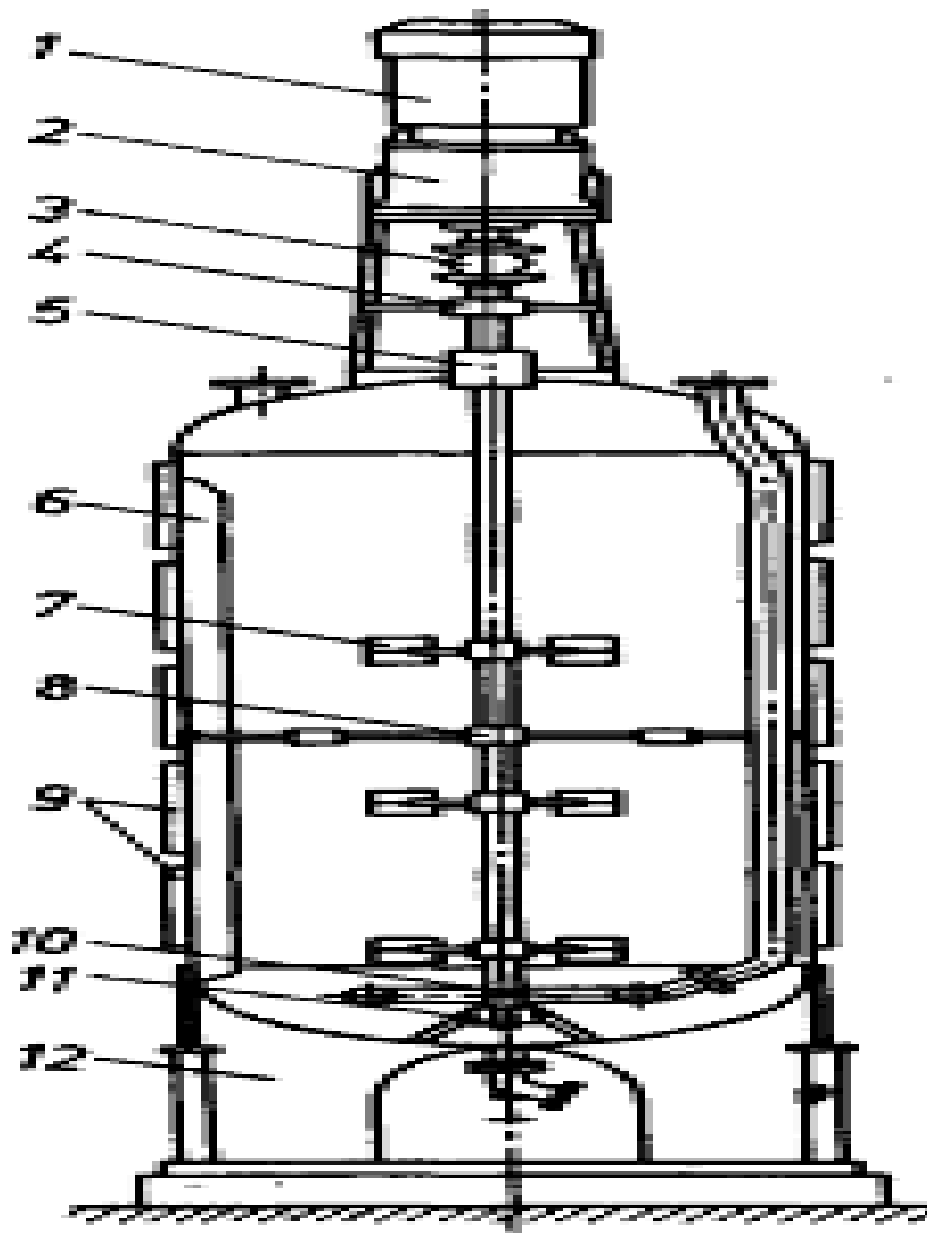


Рис. 14. Принципова схема ферментатора (Беккер, 1974):

1 – електродвигун; 2 – редуктор; 3 – муфта; 4 – прокладка; 5 – сальник кришки; 6 – ребра корпусу; 7 – триступеневий змішувач; 8 – тяжі центрування вала змішувача; 9 – теплообмінник; 10 – повітряний барботер; 11 – ложе підшипника; 12 – опора.

Основна вимога до ферментатора – можливість проведення процесу культивування продуцента в асептичних умовах при інтенсивній аерації середовища. Для підтримки стерильних умов ферментатори мають бути абсолютно герметичними, а всі лінії трубопроводів мають бути доступні для обробки гарячою парою. В процесі культивування доводиться мати справу з складною трифазною системою: рідина – тверда суспензія – газ. У такій системі ускладнені процеси масообміну і тому ускладнюється апаратурне оформлення всієї стадії вирощування.

Сучасні ферментатори містять вимірювальні прилади та регулюючі пристрої. Ферментатори обладнані пристроями для піногасіння та оглядовими люками. Ферментатори також обладнані апаратурою та трубопроводами для подачі поживного середовища, води, пари, розчину, що регулює рН, піногасників, повітря тощо.

Використовуються ферментатори з пневматичним перемішуванням та аерацією середовища. Усередині таких ферментаторів вмонтовуються форсунки, дифузори, барботери для подачі повітря. Такі ферментатори можуть бути циліндричними, кульоподібними, горизонтальними із звичайним та інтенсивним масообміном.

Дуже важливо переконатися, що у ферментаторі забезпечуються асептичний режим культивування, дотримання всіх параметрів росту мікроорганізмів і створюються сприятливі умови для біосинтезу цільового продукту. Для дотримання цієї вимоги ферментатори повинні витримувати жорстку стерилізацію і працювати впродовж всього культивування під високим тиском.

Послідовність процесу культивування мікроорганізмів є загальною як для глибинного (рис. 15), так і для поверхневого (рис. 16) способу культивування. Вона включає стадії приготування посівного матеріалу, приготування поживного середовища, його стерилізації, охолодження, засіву посівним матеріалом та вирощування. Проте залежно від способу культивування апаратурне оформлення технологічної схеми істотно розрізняється.

Технологічні схеми глибинного культивування (див. рис. 14) аеробних і анаеробних мікроорганізмів майже не відрізняються одна від одної, за винятком того, що в схемах культивування анаеробних мікроорганізмів виключається стадія підготовки повітря і використовуються ферментатори без аеруючих і перемішуючих пристроїв.

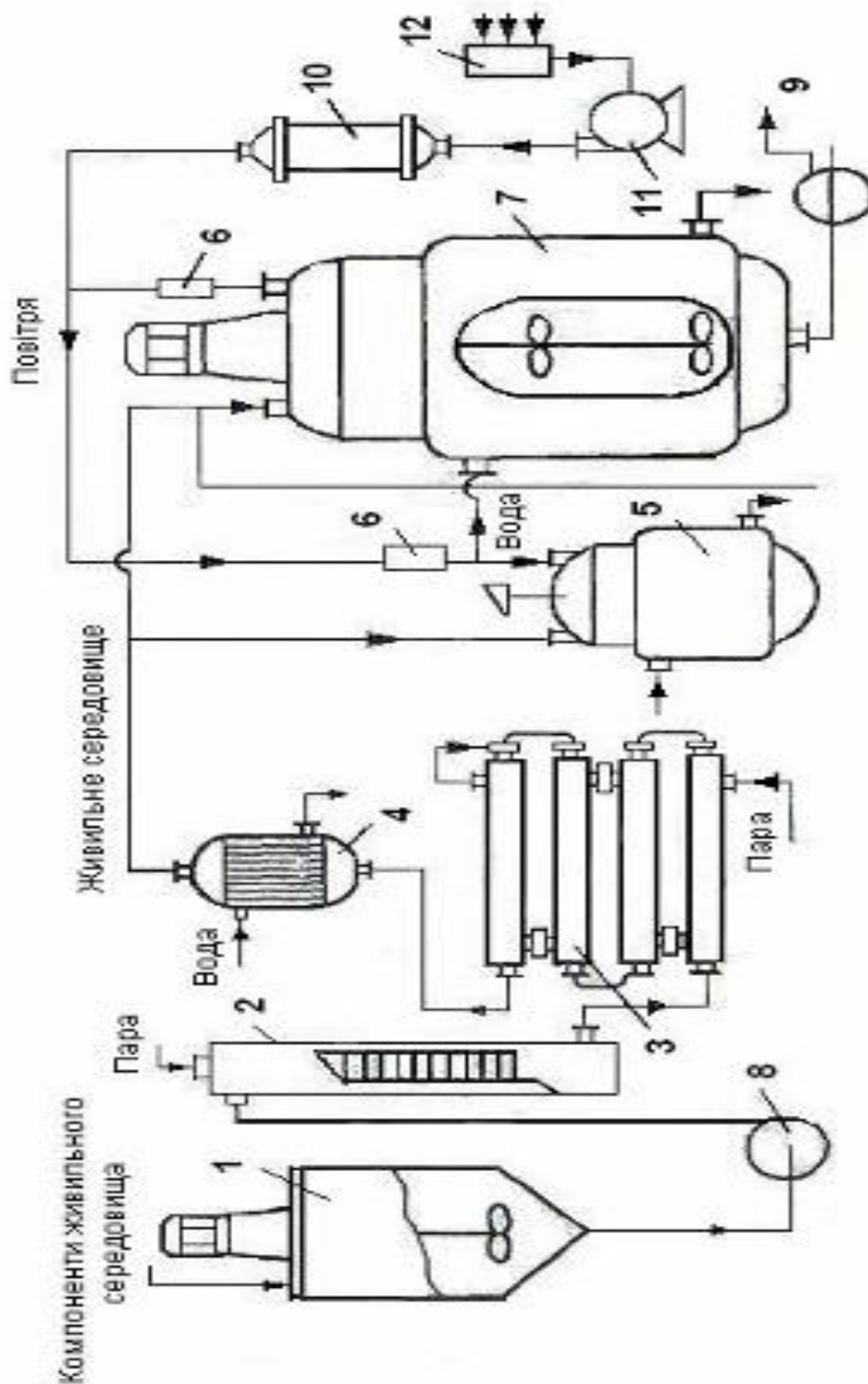


Рис. 15. Принципова технологічна схема глибинного культивування мікроорганізмів (А.А. Світцов, 1986):

1 – змішувач живильного середовища; 2 – стерилізатор у безперервному потоці живильного середовища; 3, 4 – теплообмінники; 5 – інокулятор; 6, 10, 12 – фільтри для очищення повітря; 7 – ферментатор; 8, 9 – насоси; 11 – компресор

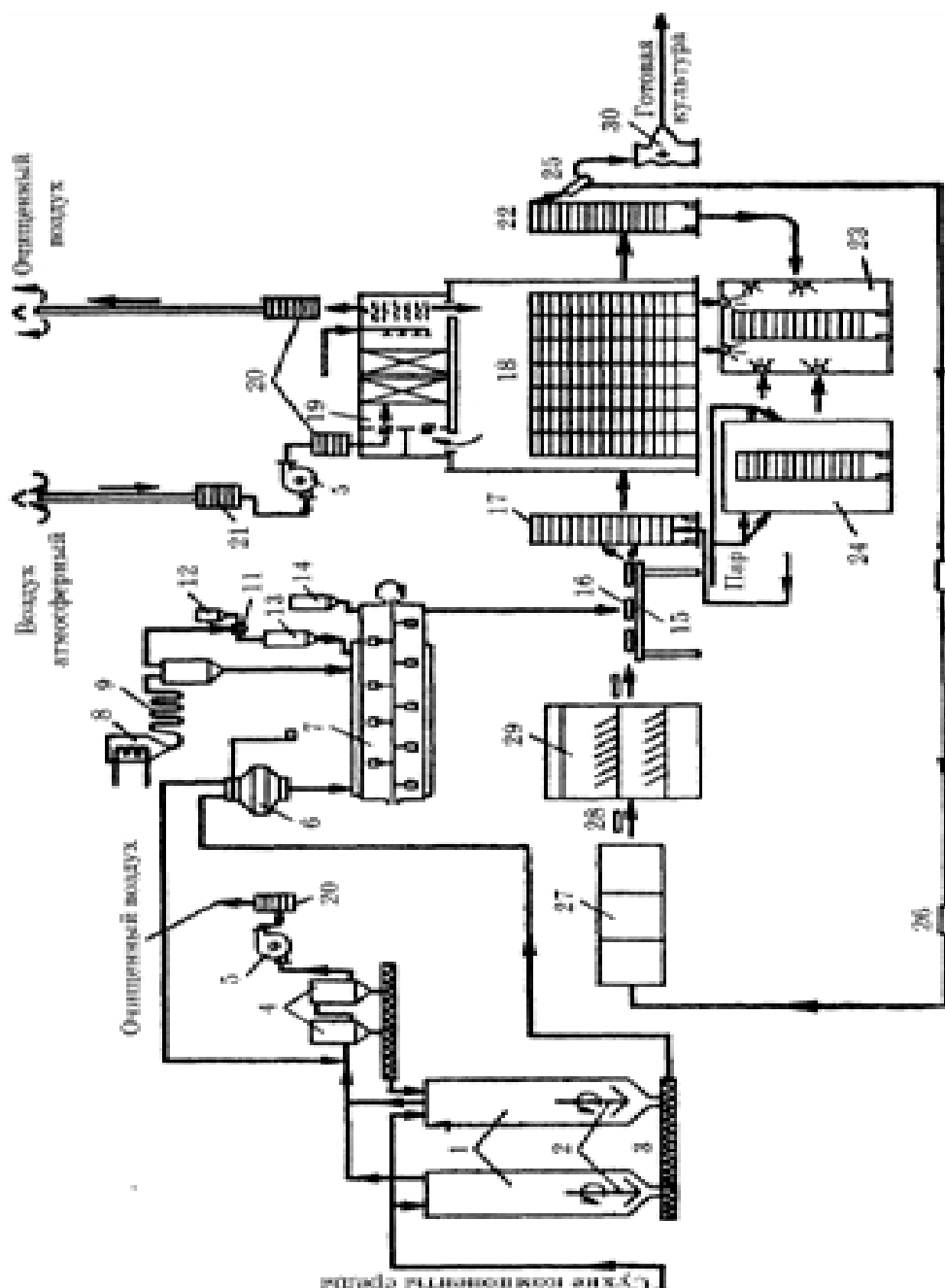


Рис. 16. Принципова схема отримання культури мікроорганізму поверхневим способом на твердому середовищі:

1 – бункери; 2 – пристрої для перемішування; 3 – шнек; 4 – циклони для очистки повітря відводу; 5 – вентилятор; 6 – автоматичний дозатор висівок; 7 – стерилізатор сипучих компонентів; 8 – стерилізатор для води; 9 – теплообмінник; 10 – мірник стерильної води; 11 – дозатор; 12 – мірник для концентрованої кислоти; 13 – мірник для розчину соляної кислоти; 14 – ємність для засівної культури; 15 – стіл для завантаження; 16 – кювета; 17 – пересувна етажерка для переміщення кювет; 18 – зрошувальна камера; 19 – кондиціонер; 20 – фільтри тонкого очищення повітря; 21 – фільтри попереднього очищення повітря; 22 – етажерка із готовою культурою; 23 – камера для миття етажерок; 24 – камера для стерилізації етажерок; 25 – кювета на розвантаженні; 26 – забруднена кювета; 27 – миття кювет; 28 – чиста кювета; 29 – камера для стерилізації кювет; 30 – подрібнювач для готової культури.

Матеріали та обладнання:

Стерильна водопровідна вода, стерильні чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем, конічні колби з рідким поживним середовищем, чиста культура промислових мікроорганізмів, стерильні піпетки (1,0, 2,0, 5,0 мл), мікробіологічна петля, спиртівка, мікроскоп, технологічні схеми поверхневого та глибинного культивування промислових мікроорганізмів.

Порядок виконання роботи

1. Розглянути та зарисувати технологічні схеми поверхневого та глибинного культивування мікроорганізмів у біотехнологічній промисловості.
2. Засіяти рідке та тверде поживне середовище чистою культурою промислового мікроорганізму та здійснити культивування.
3. Після культивування вивчити морфологію мікроорганізмів та порівняти способи вирощування.
4. Зробити висновки та оформити роботу.

Контрольні питання:

1. Наведіть технологічні стадії культивування мікроорганізмів.
2. Наведіть промислові способи культивування мікроорганізмів.
3. Наведіть переваги глибинного культивування мікроорганізмів.
4. Наведіть складнощі, що виникають під час глибинного культивування мікроорганізмів та шляхи їх подолання.
5. Яка апаратура являється основною під час глибинного культивування та які вимоги висуваються до неї?
6. Наведіть способи поверхневого культивування мікроорганізмів, їх переваги та недоліки.
7. У яких апаратах відбувається процес основної ферментації?
8. Наведіть будову кювети?
9. Наведіть засоби механізації та автоматизації глибинного способу культивування?
10. Характеристика глибинного методу культивування в ідеальному біореакторі періодичної дії.

Лабораторна робота №10

Тема. Культивування аеробних мікроорганізмів

Мета: Ознайомитися з прийомами культивування мікроорганізмів в аеробних умовах.

Завдання: Приготувати поживне середовище (рідке середовище розлити по колбах, а щільне по чашкам Петрі), простерилізувати та стерильно розлити в посуд. Провести засів поживних середовищ культурою аеробних мікроорганізмів та дослідити морфологію мікроорганізмів.

Теоретичні основи

Вирощування мікроорганізмів на поживних середовищах називається культивуванням (*cuitus* 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 тощо).

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 облигатні аероби ростуть у вигляді рясних плівок.

Факультативні аероби (анаероби) розвиваються як у товщі рідкого середовища, утворюючи суспензії, пластівці, осад, так й 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 цитринової 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, 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. Оскільки, мікробні клітини здатні використати тільки розчинений кисень, а розчинність його невелика (4–7 мг/л), доводиться увесь час його поповнювати в культуральній рідині. 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 об'ємах 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, об'ємом середовища в посудинах і застосуванням спеціальних колб із 4-8 втисненими усередину відросткам – відбійниками для розбризкування рідини. Ефективність насичення середовища киснем за такого методу можна виміряти з певною погрішністю сульфітним методом. Водяний розчин сульфіту, рівні об'єми 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 проводять у лабораторних ферментаторах (рис. 17).

Це скляні апарати об'ємом 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.

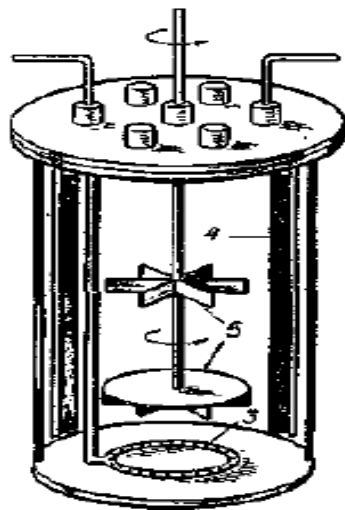


Рис. 17. Лабораторний ферментатор.

1 – надходження повітря; 2 – вихід повітря; 3 – барботер; 4 – відбійники; 5 – мішалка

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 важливе значення для керування процесом безперервного культивування у виробничих умовах, дозволяє економно витрачати 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.

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.

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 по колбах, а щільне по чашкам Петрі.
3. Провести засів поживного середовища культурою аеробних мікроорганізмів.
4. Колби помістити 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.
7. Зробити висновки та оформити роботу.

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 гетерогенного безперервним культивуванням.
5. Узагальнена схема біотехнологічних виробництв аеробних мікроорганізмів.

Лабораторна робота №11

Тема. Культивування анаеробних мікроорганізмів

Мета: Ознайомитися з прийомами культивування мікроорганізмів в анаеробних умовах.

Завдання: Приготувати поживне середовище (рідке середовище розлити по колбах, а щільне по чашкам Петрі), простерилізувати та стерильно розлити в посуд. Провести засів поживних середовищ культурою анаеробних мікроорганізмів та дослідити їх морфологію.

Теоретичні основи

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 впродовж 15–20 хв та швидким охолодженням під струменем холодної води. Після засіву поверхню середовища, розлитого високим шаром, заливають шаром стерильної суміші вазелінової олії н-парафіну. Культивування анаеробів можна здійснювати в спеціальних пробірках (рис. 18), з яких після засіву відкачують повітря за допомогою вакуум-насосу.

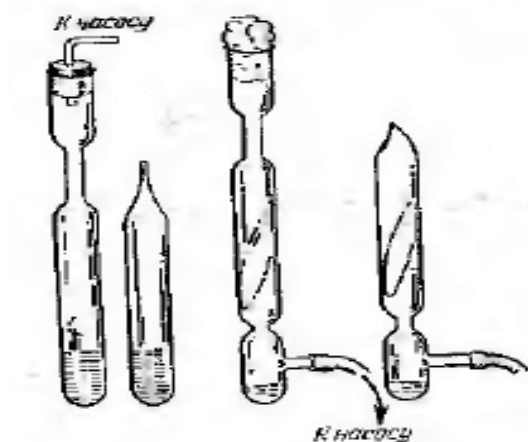


Рис. 18. Пробірки для культивування анаеробів

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 проводять в анаеростатах. Анаеростати – це вакуумні металеві або скляні ексикатори, які добре зберігають високе розрідження впродовж тривалого часу. Металевий анаеростат (рис. 19) – це циліндр із щільної герметично закритою кришкою. На кришці встановлені манометр і кран, за допомогою якого прилад приєднують до насосу.



Рис. 19. Анаеростат

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 (рис. 20) 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, проводять за допомогою хімічних речовин. Деякі з них поміщають поза середовищем, інші вводять як відновник безпосередньо в поживне середовище.

Хімічними поглиначами кисню є розчини пірогалолу з Na_2CO_3 , лужний розчин гідросульфїту натрію (дитіонїту), металічне залізо й інші реактиви. Речовини, що з'єднують кисень повинні мати високу поглинаючу здатність.



Рис. 20. Скляний вакуумний ексикатор

Наприклад, 1 мл, 20%-вого пірогалолу 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 (рис.21). Відкриті чашки Петрі зі злегка зволеним пірогалолом 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%-вий водяний розчин метиленового синього й 0,5%-вий 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 $0,005 \text{ МПа}$.

Як відновлювач, що додають у поживне середовища для культивування анаеробів, використовують органічні й неорганічні речовини: редукуючі цукри (глюкоза), речовини із сульфгидрильною групою (цистеїн, глутатіон), аскорбінову кислоту, пірокатехін, мурашинокислий натрій, сульфїди, сірководень, гідросульфїт натрію,

цитрат титану, а також деякі складні компоненти – пептон, шматочки печінки, м'язів, картоплі, яєчного білка.

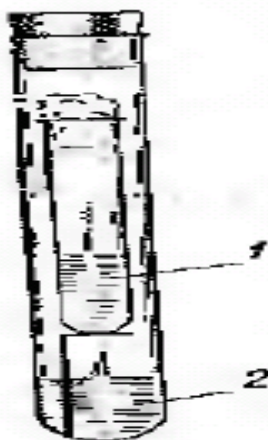


Рис. 21 – Вирощування анаеробів у пробірках.

1 – культура; 2 – поглинач кисню

Біологічні методи. Деякі анаеробні мікроорганізми можна вирощувати при доступі кисню разом з аеробами. У герметично закриті посудину поміщають 10-15 пробірок з посівами аеробних культур й одну пробірку з анаеробами. Аеробні мікроорганізми енергійно поглинають кисень, виділяють CO_2 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 – це поєднання вищевказаних способів видалення кисню.

Матеріали, реактиви й устаткування:

Пробірки, чашки Петрі, термостат, анаеростат, парафін, вазелінова олія, хімічні поглиначі кисню, мікроскоп, предметні та покривні скельця.

Хід роботи:

1. Вимити, просушити та простерилізувати посуд в якому буде відбуватися культивування.
2. Приготувати поживне середовище (рідке та щільне), простерилізувати та стерильно розлити в посуд. Рідке середовище розлити в пробірки, щільне в пробірки та чашки Петрі. Одну пробірки з щільним середовищем розмістити під кутом для застигання.
3. Провести засів поживного середовища культурою анаеробних мікроорганізмів.
 - А) Дві пробірки (з рідким та щільним середовищами) помістити в анаеростат, в якому знаходиться поглинач кисню.
 - Б) Чашки Петрі, краї яких змащені парафіном помістити в термостат.
 - В) Пробірки із скошеним середовищем після засіву залити вазеліною олією та помістити в термостат.
4. Через добу провести огляд пробірок та чашок. Всі спостереження необхідно занести в лабораторний журнал.
5. Повторні огляди необхідно повторити на 2 та 3 дні.
6. Зробити висновки та оформити роботу.

Контрольні питання

1. Наведіть приклади мікроорганізмів – анаеробів.
2. В чому різниця між факультативними анаеробами та облигатними анаеробами?
3. Якими способами можна створити анаеробні умови для вирощування мікроорганізмів?
4. Узагальнена схема біотехнологічних виробництв анаеробних мікроорганізмів.
5. Підготовка поживних середовищ для виробничого біосинтезу анаеробних мікроорганізмів.
6. Зберігання та дозування компонентів поживного середовища, способи стерилізації поживних середовищ для анаеробних мікроорганізмів.
7. Контроль якісних показників поживних середовищ для культивування анаеробних мікроорганізмів.
8. Одержання посівного матеріалу для поверхневого та глибинного культивування анаеробних мікроорганізмів.

Лабораторна робота №12

Тема. Ріст мікроорганізмів у періодичній (статичній) культурі. Вплив умов культивування на показники росту мікроорганізмів.

Мета: Дослідження росту культури за періодичного культивування.

Завдання: В експериментальних умовах провести культивування дріжджів роду *Saccharomyces* і бактерій та визначити параметри їх росту залежно від умов культивування. Побудувати криву росту. Розрахувати кінетичні показники періодичного культивування.

Теоретичні основи

До промислових способів культивування мікроорганізмів належать періодичне, безперервне культивування та культивування іммобілізованих клітин. Найбільш поширений спосіб періодичного культивування. При даному способі інокулянт вносять у поживне середовище, яке містить задану кількість всіх необхідних поживних речовин. При цьому ні один з істотних компонентів середовища не надходить у систему в процесі культивування, тобто це замкнута система. Періодичне культивування застосовується як для поверхневих культур (на поверхні твердого поживного середовища), так і глибинних культур (у рідкому поживному середовищі).

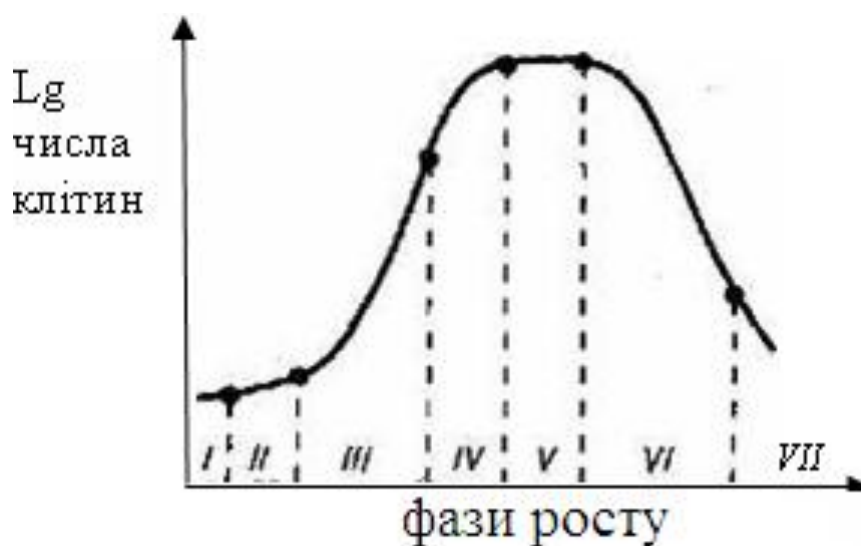


Рис. 22. Крива росту культури мікроорганізмів.

I – лаг-фаза; II – фаза прискореного росту; III – фаза логарифмічного росту (експоненціальна); IV – фаза уповільненого росту через нестачу джерел живлення або через накопичення інгібуючих продуктів; V – стаціонарна фаза; VI – фаза відмирання клітин; VII – фаза виживання клітин.

Ріст мікроорганізмів у поживному середовищі припиняється тоді, коли вміст будь-якого з необхідних компонентів середовища досягає мінімуму або у середовищі накопичуються продукти метаболізму, що інгібують ріст мікроорганізмів. Крива (рис.22), що описує залежність логарифма числа живих клітин від часу, називається кривою росту. Типова крива росту періодичної культури мікроорганізмів, зображена на рисунку, має S-подібну форму і характеризується різними фазами, пов'язаними із зміною складу поживного середовища, складом біомаси та фізіолого-біохімічними властивостями мікроорганізмів.

У процесі культивування мікроорганізмів у безперервній культурі всі компоненти поживного середовища постійно надходять у систему і виводяться з неї. Це відкрита система і культивування здійснюється тільки в глибинній культурі, найчастіше аерованій.

Культивування іммобілізованих клітин відбувається шляхом прикріплення клітин мікроорганізмів (іммобілізація) на будь-якого інертного носія. Поживне середовище постійно надходить у систему й виводиться з неї, тобто це теж відкрита система.

Для культивування мікроорганізмів необхідна наявність життєздатної засівної культури (інокуляту), поживного середовища, що містить всі необхідні елементи живлення (джерело енергії, вуглецю, макро- і мікроелементів та, у разі потреби, фактори росту), відсутність у середовищі різного роду інгібіторів росту. Необхідна, також підтримка оптимальних для росту мікроорганізмів фізико-хімічних умов навколишнього середовища (температура, рН, тиск, умови аерації, джерела світла тощо).

Основні параметри росту мікроорганізмів. Для кількісної характеристики культивування мікроорганізмів користуються двома показниками – середньою та питомою швидкістю росту. Середня швидкість росту V характеризується приростом біомаси за одиницю часу:

$$V = \frac{X - X_0}{\tau - \tau_0},$$

де x_0 – кількість біомаси на початку культивування, кг/м³; x – біомаса за час культивування τ , кг/м³; τ_0 і τ – початковий і кінцевий час відліку відповідно, год.

Питома швидкість росту характеризує годинний приріст на одиницю зростаючої біомаси:

$$\mu = \frac{dx}{dt} \times \frac{1}{x}.$$

Математична модель зростання кількості біомаси – рівняння Моно – застосовується для кількісного опису динаміки росту біомаси:

$$\frac{dx}{d\tau} = \mu x.$$

Величину μ за певний проміжок часу можна знайти, вирішивши рівняння питомої швидкості росту шляхом логарифмування:

$$\mu = \frac{\ln \frac{x_0}{x}}{\tau - \tau_0} \quad \text{або} \quad \mu = \frac{2,3(\lg x - \lg x_0)}{\tau - \tau_0}.$$

Розмірність питомої швидкості μ , год⁻¹. З наведених рівнянь виходить, що питома швидкість росту залежить від кількості біомаси дріжджів, які засіваються та отриманих після культивування.

Для визначення росту мікроорганізмів використовуються ряд методів, які поділяються на прямі і непрямі методи визначення. До прямих методів належать:

- визначення біомаси ваговим або турбідиметричним методом;
- визначення кількості клітин мікроорганізмів при використанні лічильних камер або при висіванні на тверді середовища.

При використанні непрямих методів проводять визначення маси окремих компонентів клітини (білок, клітинний азот, нуклеїнові кислоти, аденозинтрифосфорна кислота тощо), маси спожитого субстрату (джерела вуглецю, азоту, кисню та ін.), маси утворених продуктів метаболізму тощо.

Матеріали та обладнання: конічні колби (250 мл), пробірки, піпетки (2, 5, 10 мл), компоненти для приготування поживного середовища, мікроскоп, камера Горяєва, чисті культури досліджуваних мікроорганізмів, спиртівка (сухе паливо), стерильна водопровідна вода.

Хід роботи.

Робота полягає в експериментальному проведенні процесу культивування дріжджів роду ***Saccharomyces*** і бактерій та дослідження параметрів їх росту залежно від умов культивування.

Техніка культивування мікроорганізмів містить наступні операції:

1. Підготовка поживного середовища.
2. Підготовка інокулята (засівного матеріалу).
3. Засів підготовленого поживного середовища.
4. Культивування за встановлених умов упродовж визначеного часу.

Робота проводиться в три етапи.

На першому занятті:

Підготовка поживного середовища для вирощування дріжджів роду ***Saccharomyces***:

Поживне середовище (I) (г/л): глюкоза – 10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,5; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 0,8; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; FeSO_4 – 0,15; ZnSO_4 – 0,015; MnSO_4 – 0,015; дріжджовий автолізат – 1 мл або пептон – 10,0 г/л.

Поживне середовище (II) (г/л): цукроза або глюкоза – 50,0; пептон – 10,0; KH_2PO_4 – 0,5. Кожне середовище готується в об'ємі 1 л. Визначається рН в обох середовищах.

Кожне підготовлене поживне середовище розливається по 50 мл у 10 конічних коливальних колб та по 50 мл у 10 колб для термостату і стерилізується за 0,5 атм. 20 хв. Загальна схема досліду наведена у табл. 4.

Таблиця 4. Загальна схема досліду для вирощування дріжджів роду ***Saccharomyces***.

Склад поживного середовища	Дріжджі	
	t, °C	Умови аерації
1. Середовище I	26–32	інкубують на качалці
2. Середовище I	26–32	стаціонарні умови
3. Середовище II	26–32	інкубують на качалці
4. Середовище II	26–32	стаціонарні умови

На другому занятті:

1. Підготовка інокулята (засівного матеріалу).

Чисті культури дріжджів і бактерій вирощуються на твердому поживному середовищі (косяки): сусло-агарі і МПА (м'ясо-пептоновий агар) відповідно, впродовж 48 год за температури 28–32°C і 37–38°C відповідно. Культури, що вирости, використовують як посівний матеріал. Дозволяється проводити розведення пресованих дріжджів роду *Saccharomyces* у водопровідній воді.

2. Порахувати кількість клітин у суспензії, що засівається.

Підрахунок проводити у камері Горяєва, роблячи розведення для зменшення кількості клітин у полі зору. Зробити перерахунок кількості клітин враховуючи об'єм суспензії, що засівається.

3. Засів підготовленого поживного середовища.

Засівають підготовлене до досліду поживне середовище таким об'ємом засівної суспензії, щоб забезпечити у дослідній колбі кількість засівного матеріалу 0,5% і 1% (залежно від варіанта досліду). Або вносять відому кількість клітин у поживне середовище. Інокулят вносять за використання техніки, що забезпечує стерильність операції. У кожную колбу із 50 мл поживного середовища вносять 0,5 мл або менше, приготованої суспензії дріжджових клітин, залежно від вихідної кількості клітин у приготовленій суспензії.

Для визначення кількості клітин також можна застосовувати фотоелектрокалориметр (ФЕК). Вимірюють на фотоелектрокалориметрі величину світлорозсіювання суспензії культур, що вирости, які використовують як інокулят. Поживне середовище для мікроорганізмів, в якому передбачається визначати біомасу за світлорозсіюванням має бути оптично прозорим. Якщо помутніння середовища пов'язане з випаданням в осад солей, найчастіше фосфатів, то перед вимірюванням світлорозсіювання середовище підкисляють декількома краплями концентрованої соляної кислоти.

Для вимірювання світлорозсіювання вибирають світлофільтр, що забезпечує максимальне пропускання світла даної суспензії. Світлорозсіювання суспензії дріжджів у безбарвних середовищах вимірюють із зеленим або синьо-зеленим фільтром проти води і виражають в одиницях оптичної щільності. За високих концентрацій клітин у культуральному середовищі розсіювання світла посилюється, що призводить до отримання занижених результатів. Тому, суспензію з високою щільністю клітин, перед вимірюванням світлорозсіювання, слід розводити середовищем або водою. Для культур, що досліджуються за

даними графіками залежності показників фотоелектроколориметра від числа клітини і біомаси, визначають вміст клітин або сухої біомаси в одиниці об'єму середовища.

4. Відлік часу культивування слід починати з моменту внесення до поживного середовища засівних дріжджів. Культура інкубується у 10 колбах на термостатованих качалках (аеробні умови) та у 10 колбах у термостаті (умовно анаеробні умови) за 28–32°C окремо для кожного поживного середовища.

На третьому занятті:

1. У динаміці визначаються параметри росту культури. Для цього темпорально (наприклад, кожні 2 год), за дотриманням стерильності відбирається 1 мл суспензії культури або знімається 1–2 досліджуванні колби. Досліджувані колби, що знімаються, переносяться до холодильника і підраховуються на третьому занятті. Дослід проводити не більше 3-х діб, що є оптимальним часом проліферації дріжджів роду ***Saccharomyces***. Визначається оптична щільність суспензії, при вирощуванні дріжджів підраховується кількість клітин у камері Горяєва, культури мікроскопуються.

Для підрахунку дріжджів 1–2 краплі поживного середовища з біомасою клітин відібрати піпеткою, нанести її на поверхню рахункової камери, попередньо притерши покривне скло до сторін камери до появи веселкових кілець (кілеця Ньютона). Камеру помістити на предметний столик і з об'єктивом 8х знайти зображення сітки, а потім замінити об'єктив на 40х. Вести підрахунок через 3–5 хв від моменту заповнення. Підрахувати кількість клітин у 10 великих або 20 малих квадратах сітки, розташованих по діагоналі. Врахувати всі клітини, які лежать у квадратику сітки та пересікають верхню і праву сторони квадрата. Визначити середнє число N_{cp} дріжджів у квадраті. Число дріжджів в одному квадраті не має бути більше 20, інакше проводять розведення вихідної суспензії і повторюють підрахунок. Кількість клітин у 1 мл суспензії обчислюють за формулою:

$$X = \frac{N_{cp} \cdot 1000}{h \cdot S},$$

де N_{cp} – середнє число дріжджів у квадраті, шт.; h – глибина камери (0,1), мм; S – площа квадрату сітки (великого 1/25, малого 1/400), мм².

Зробити перерахунок кількості клітин із урахуванням об'єму поживного середовища (50 мл).

2. При мікроскопіюванні дріжджів готується препарат “роздавлена крапля”, забарвлений метиленовим синім і мікроскопується з об'єктивом 40х. Дослід закінчується при зниженні приросту біомаси.

3. За одержаними даними будується графік – крива росту, визначається тривалість лаг-фази, розраховується величина питомої швидкості росту в логарифмічній стадії та вихід біомаси від заданого субстрату після завершення експерименту. Все це робиться для обох поживних середовищ, таким чином визначають кращі умови культивування для дріжджів роду *Saccharomyces*. Результати дослідження вносити до табл. 5.

Таблиця 5. Визначити параметри росту культури (μ , год⁻¹) і записати у вигляді таблиці.

Варіант досліджу	Тривалість культивування, год	Середнє число клітин у 10 квадратах, шт.	Кількість клітин у 1 мл, шт.	μ , год ⁻¹

Контрольні питання

1. Назвіть основні відмінності періодичного і безперервного культивування?

2. Які фази розвитку проходить біомаса клітин в умовах періодичного культивування?

3. Які показники використовують для характеристики процесів зростання популяції мікроорганізмів?

4. У яких одиницях вимірюється питома швидкість росту, загальна швидкість росту?

5. Як можна змінити питому швидкість росту?

6. Логістична крива, як приклад однопараметричної моделі розвитку популяції.

7. Модель експоненційного росту.

8. Кінетичні рівняння Моно, Ферхюльста-Пірла-Ріда, Ендрюса та інших.

Лабораторна робота №13

Тема. Методи виділення та очищення кінцевих продуктів біотехнологічних виробництв.

Мета: Вивчити методи виділення та очищення кінцевих продуктів біотехнологічного виробництва.

Завдання: 1. Виділити шляхом центрифугування одержану білкову біомасу базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* з культуральної рідини після глибинного культивування.

2. Екстрагувати β -каротин з мукорового гетеролічного гриба *Blakeslea trispora*, що є промисловим продуцентом β -каротину.

Теоретичні основи

Завершальні стадії біотехнологічного процесу – виділення цільового продукту – істотно різняться залежно від того, накопичується продукт у клітині або він виділяється у культуральну рідину, або ж продуктом є клітинна біомаса. Найбільш складним є виділення внутрішньоклітинного продукту. При цьому клітини необхідно відокремити від середовища культивування, піддати їх руйнуванню, а потім цільовий продукт очистити від залишків зруйнованих клітин.

Виділення продукту істотно полегшується, якщо він екскрагується продуцентом у культуральну рідину. Тому однією з первинних завдань біотехнології є створення промислових штамів мікроорганізмів, які виділяють якомога більшу кількість цінних продуктів у значних кількостях.

Технологія виділення та очищення значною мірою визначається природою цільового продукту. У ряді випадків не потрібне ретельне очищення продукту: продукт володіє необхідною активністю в неочищеному стані; домішки сторонніх речовин у продукті не надає жодного небажаного впливу при його застосуванні. Деякі традиційні біотехнологічні процеси взагалі виключають етап відділення продукту.

Першим етапом у процесі очищення цільового продукту є поділ культуральної рідини і клітинної біомаси – **сепарація**. У деяких випадках перед сепарацією відбувається спеціальна обробка реакційної суміші, яка сприяє більш ефективному відділенню біомаси та стабілізації продукту, що виділяється. Застосовуються різні методи сепарації.

Флотація. Метод використовується в тому випадку, якщо клітини продуцента через низьку гідрофільність накопичуються у поверхневих

шарах культуральної рідини біореактора. Особливі пристрої (флотатори) різної конструкції видаляють піну разом з прилиплими до бульбашок газу клітинами, що утворюється при культивуванні. Підвищення ефективності відбору біомаси досягається спінюванням рідини з подальшим відділенням її верхнього шару механічним шляхом. Перевагами методу є його економічність, висока продуктивність та можливість використання у безперервних процесах.

Фільтрація. Застосовуються різні фільтруючі системи (барабанні, стрічкові, тарілчасті фільтри, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси, мембранні фільтри) засновані на однаковому принципі – затримки біомаси на пористій фільтруючій перегородці. Недоліком способу є налипання клітин на фільтрі, шар яких знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування.

Центрифугування. Даний спосіб потребує більш дорогого устаткування, ніж фільтрування, тому він застосовується якщо:

- а) суспензія фільтрується занадто повільно;
- б) виникає необхідність максимального звільнення культуральної рідини від частинок, що в ній містяться;
- в) потрібно забезпечити безперервний процес сепарації, коли фільтри розраховані на періодичну дію.

Центрифугування і фільтрацію в деяких біотехнологічних процесах застосовують у комбінації, тобто застосовуються фільтраційні центрифуги, в яких розподіл рідкої і твердої фаз заснований на двох процесах фільтрування та центрифугування.

Методи руйнування клітин

Руйнування клітин проводиться фізичними, хімічними і ферментними методами. Найбільше промислове значення мають фізичні способи руйнування клітин:

1. ультразвуком;
2. лопатками або вібрацією – метод, зазвичай використовують у пілотних і промислових установках;
3. струшуванням із скляними намистами;
4. продавлюванням через вузькі отвори під високим тиском;
5. роздавлюванням замороженої маси;
6. розтиранням у спеціальних ступках;
7. за допомогою осмотичного шоку;
8. багатократним заморожуванням і відтаванням;
9. стискуванням клітинної суспензії з наступним різким зниженням тиску (декомпресією).

Фізичні способи руйнування відрізняються більшою економічністю порівняно з іншими методами, проте вони характеризуються відсутністю вираженої специфічності, внаслідок чого обробка може негативно впливати на якість одержаного цільового продукту.

Виділення та очищення цільових продуктів

Виділення цільового продукту з культуральної рідини або одержаного у результаті процесів дезінтеграції гомогенату зруйнованих клітин здійснюється шляхом осадження, екстракції або за допомогою різних методів адсорбції.

Осадження розчинених речовин здійснюється фізичними (нагрівання, розведення або концентрування, охолодження розчину) або хімічними факторами, що переводять розчинну речовину в малорозчинний стан. Залежно від мети і властивостей продукту, який виділяється, підбирається той чи інший метод та фактор дії, тобто підбирається реагент тощо.

Екстракція поділяється на твердо-рідиннофазну (за якого продукт із твердої фази переходить у рідку) та рідинно-рідиннофазну (коли забезпечується переведення продукту з однієї рідинної фази в іншу, також рідинну фазу). Твердо-рідиннофазна екстракція зводиться часом до простої обробки твердого зразка водою або органічним розчинником з метою вилучення з нього розчинних сполук. Досить широко застосовуються різні органічні розчинники, зокрема екстрагування ацетоном, який ефективно переводить у розчин ряд ліпідних і білкових компонентів клітин.

Адсорбція є досить поширеним методом виділення продукту і розглядається як окремий випадок екстракції, при якому екстрагуючим агентом служить тверде тіло. Механізм її зводиться до зв'язування речовини, що виділяється з рідкої або газоподібної фази поверхнею твердого тіла. Традиційними адсорбентами є деревне вугілля, пористі глини тощо.

Більш сучасні методи розділення речовин включають хроматографію, електрофорез, ізотахофорез, електрофокусування, які засновані на принципах екстракції та адсорбції.

Поділ речовин шляхом хроматографії засновано на їх неоднаковому розподілі між двома фазами, що не змішуються. Розрізняють хроматографію на папері, пластинках та колонках. При хроматографії на папері або на пластинках однією з фаз, що не змішуються, є рухомий розчинник, а іншою (нерухомою фазою) служать волокна паперу та інших пористих волокон. При хроматографії на колонках рухомою фазою

є розчинник, що протікає через колонку, а нерухому фазу представляє адсорбент, що заповнює колонку (найчастіше це гранульований гель). Хроматографія на колонках допускає масштабування процесу, в результаті чого вона досить широко застосовується в промислових умовах і включає кілька різновидів. Один з них – йонообмінна хроматографія, колонка наповнюється гранулами адсорбенту, які несуть заряджені катіонні (NH_4^+) або аніонні (SO_4^{2-}) групи, здатні захоплювати йони протилежного заряду. Даний метод використовується для виділення йонізованих речовин з рідини, а також для очищення нейтральних сполук від домішок йонної природи.

Матеріали та обладнання:

Культуральна рідина *Pleurotus ostreatus*, культура *Blakeslea trispora*, центрифуга, сушильна шафа, ацетон, колба Бунзена, фотоелектроколориметр.

Хід роботи.

1. Розглянемо метод відділення – центрифугування у біотехнології на прикладі одержання білкової біомаси базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* з культуральної рідини, після глибинного культивування. Культуру гриба, що виросла в процесі ферментації, відокремити від культуральної рідини центрифугуванням за 5000 об./хв упродовж 10 хв у спеціальних сталевих стаканах з фільтрувальною перегородкою, на яку укладається капроновий фільтр. Визначити загальну сирю біомасу вирощеного міцелію *Pleurotus ostreatus*. Отриманий продукт можна використовувати в сирому вигляді, але він не зберігається. Для зберігання міцелію застосовуються методи обробки сушінням або заморожуванням. Сушіння провести у сушильній шафі за температури 105°C до постійної маси.

2. Розглянемо метод екстракції на прикладі мукорового гетеролічного гриба *Blakeslea trispora*, що є промисловим продуцентом β -каротину. Метод заснований на екстрагуванні β -каротину з біомаси міцелію грибу ацетоном та визначенні екстинкції забарвленого екстракту на фотоелектроколориметрі. Приготувати розчин двохромовокислового калію, що застосовують як стандарт. 1 мл його за забарвленням відповідає розчину, що містить 0,00208 мг каротину. Близько 0,1 г препарату (сирого міцелію), ретельно розтирають у порцеляновій ступці з дрібним склом або кварцовим піском, додаючи 10 мл етилового спирту. Здрібнену біомасу кількісно переносять у лійку Шотта, куди насипають дрібне скло

або кварцовий пісок, відфільтровують і потім багаторазово до повної екстракції β -каротину та відповідно до знебарвлення розчину промивають її ацетоном, не допускаючи підсихання осаду на фільтрі.

Екстракт з каротином зібрати у колбу Бунзена, а потім перенести у мірну колбу ємністю 100 мл і довести об'єм розчину ацетоном до мітки (розчин А). У випадку інтенсивного забарвлення розчину його треба розбавити у 2 чи більше разів з таким розрахунком, щоб оптична щільність випробуваного розчину була близькою до оптичної щільності стандартного розчину. Оптичну щільність отриманого розчину вимірюють на фотоелектроколориметрі в кюветі товщиною 1 см за довжини хвилі 451 нм.

3. Зробити висновки та оформити роботу.

Контрольні питання

1. Попередня обробка клітинних суспензій – це
2. Охарактеризувати способи розділення твердої та рідкої фаз культуральної рідини (фільтрування, центрифугування, сепарування).
3. Екстракція цільового продукту.
4. Принципи та типові технологічні рішення виділення цільових продуктів біосинтезу.
5. Обґрунтування та вибір способів виділення залежно від характеристик продукту та місця його локалізації.
6. Способи концентрування біомаси: відстоювання, флотація, осадження в полі штучно створених гравітаційних сил.
7. Стабілізація продукту. Наповнювачі та стабілізатори активності БАР.
8. Способи сушки продуктів. Вакуум-висушування, розпилююча та сублімаційна сушка.
9. Вибір способу висушування залежно від характеристик субстанції та вимог до готового продукту.
10. Термочутливість та ксерочутливість продуктів біосинтезу мікроорганізмів.

Лабораторна робота №14

Тема. Технологічний контроль на підприємствах біотехнологічної промисловості.

Мета: Вивчити види контролю на біотехнологічних підприємствах. Здійснити контроль якості сировини та готового продукту.

Завдання: Визначення титру кишкової палички, умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів у досліджуваних змивах продуктів харчування.

Теоретичні основи

На підприємствах біотехнологічної промисловості санітарно-бактеріологічний або мікробіологічний контроль є обов'язковим і здійснюється органами санітарного нагляду в плановому порядку, а також позапланово за епідемічними показниками.

Як показник санітарного стану діючого закладу широко використовується характеристика мікробного засівання поверхні різних об'єктів – приладів та обладнання, інвентарю, одягу, рук персоналу. Основними тестами мікробної забрудненості предметів є загальна кількість мікроорганізмів на одиницю поверхні досліджуваного предмета (мікробне число) і наявність на предметах санітарно-показових та недопустимих мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* тощо).

Основним методом взяття проб для дослідження мікробної забрудненості поверхні будь-якого предмета є його змив з певної площі. З цією метою стерильною серветкою, ватним тампоном, змоченими у стерильній воді, протирають певну площу поверхні об'єкта і переносять серветку/тампон у пробірку зі стерильною водою. Обережно збовтують суміш для десорбції мікроорганізмів, а одержану суспензію використовують для аналізу. Змиви з рук, рушників і санітарного одягу здійснюють до початку та після роботи. Кількість мікроорганізмів (мікробне число) у змивах часто визначають за методом Коха та виражають на одиницю поверхні досліджуваного об'єкта, найчастіше на 1 см². Залежно від ступеня мікробного засівання із різних розведень змиву беруть по 1 мл і висівають на МПА у чашках за загальноприйнятою методикою. Мікробне число визначають за такою формулою:

$$M = \frac{n \times 10}{S},$$

де: М – мікробне число; n – кількість мікроорганізмів, які містяться в 1 мл вихідного розведення змиву (для визначення цієї кількості число колоній, які виросли на МПА в чашках, перераховують з огляду на розведення); 10 – кількість рідини, яка використовувалася для десорбції мікрофлори, мл; S – площа, з якої зроблено змив, см².

Санітарний стан поверхні досліджуваного об'єкта вважається дуже відмінним, якщо загальна кількість мікробів на 1 см² складає не більше 100, добрим – якщо їх від 100 до 1000, задовільним – якщо мікробів понад 1000, поганим – якщо їх більше 10000.

Визначення титру кишкової палички у досліджуваних змивах. З цією метою посів змивів здійснюють на середовище Кесслера і ставлять чашки у термостат за температури 43°C на 24 год. Це перший етап виявлення кишкової палички, який дістав назву бродильної проби. Якщо утворення газів та помутніння не відбувається, роблять остаточний висновок про відсутність бактерій групи кишкової палички.

При виявленні газоутворення і помутніння проводять другий етап визначення кишкової палички. Для цього пересівають культуру, яка виросла на середовищі Кесслера, на диференціально-діагностичне живильне середовище Ендо. Засіяні чашки Петрі розміщують у термостаті за температури 37°C на 24 год. Після закінчення інкубації відбирають лактозопозитивні (червоні) колонії і виготовляють із них мікропрепарати, фарбують за Грамом і вивчають під мікроскопом. Якщо в полі зору виявляються грамнегативні неспороносні палички, то для остаточної ідентифікації кишкової палички проводять оксидазний тест – третій етап.

Цей тест пропонується як експрес-метод для диференціації *E. coli* від сапрофітних бактерій, що морфологічно подібні до неї, але відрізняються тим, що мають фермент оксидазу і можуть окиснювати фенілєндіамінові сполуки до індофенолу. Останній має яскраво синій колір. Для проведення оксидазного тесту бактеріологічною петлею відбирають невеличку кількість колонії, яка виросла на середовищі Ендо, на фільтрувальний папір, просочений розчином фенілєндіаміну. Якщо на місці нанесення бактеріальної маси колір паперу не змінюється, то оксидазний тест буде негативним, і, навпаки, якщо бактерії володіють оксидазною активністю, папір стає синім упродовж 1 хв.

Виявлення у досліджуваних змивах кишкової палички, умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів свідчить про грубе порушення

санітарно-гігієнічних правил та необхідність проведення негайних профілактичних заходів!

Мікробіологічний контроль хлібобулочних виробів. У хлібопекарному виробництві мікроорганізми мають важливе значення. Наприклад, такі мікроорганізми, як дріжджі та молочнокислі бактерії, спеціально використовуються для виготовлення тіста. Інші види мікроорганізмів, які потрапляють у сировину із зовнішнього середовища, можуть знижувати якість сировини, викликати псування готової продукції і бути причиною харчових отруєнь.

Сировина, яка використовується для виробництва хліба, часто буває засіяна мікробами. Так, мікрофлора борошна походить переважно від мікрофлори зерна. Кількісний та якісний склад мікроорганізмів борошна залежить від ступеню інфікованості зерна, способу його розмелювання та очистки. Загальна кількість мікробів у 1 г борошна може доходити до 3 млн. Проте, ця цифра змінюється залежно від вмісту вологи, тривалості зберігання тощо. Якість борошна значною мірою визначається вмістом у ньому неспороносних *Envina herbicola* і спороносних *Bacillus mesentericus* та *Bacillus subtilis* мікроорганізмів.

Картопляна (*B. mesentericus*) і сінна (*B. subtilis*) палички – найбільш поширені збудники мікробного процесу псування хліба. Спори цих бактерій дуже термостійкі, завдяки чому вони зберігаються у хлібі під час його випікання. При повільному охолодженні такого хліба, створюються сприятливі умови для проростання спор, що спричинює в ньому гнильні процеси. У цьому випадку м'якуш хліба стає липким і набуває неприємного запаху. Такий хліб не придатний для споживання. Картопляна хвороба найчастіше вражає пшеничний хліб влітку. Пшеничний і житній хліб часто уражується також і “крейдянною хворобою”, при якій на м'якуші хліба з'являється білий мучнистий наліт. Це міцелій цвільових грибів (наприклад *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*) і дріжджеподібних мікроорганізмів (наприклад *Saccharomyces*).

Бактеріологічний аналіз молока. Молоко – це дуже сприятливе середовище для розмноження та зберігання різних видів мікроорганізмів. Кількість їх у 1 мл молока може сягати кількох мільйонів. Засівання молока мікробами відбувається переважно під час доїння і зберігання. Традиційно у молоці переважають непатогенні неспороутворюючі мікрококи або паличкоподібні представники відділу *Lactobacillales* (наприклад, *Lactococcus lactis* або *Lactobacillus acidophilus*), молочнокислі бактерії та інші. Молочнокислі бактерії – це група мікроаерофільних грампозитивних мікроорганізмів, що зброджують

вуглеводи з утворенням молочної кислоти як одного з основних продуктів. До молочнокислих бактерій також відносять корисну неспороутворюючу мікрофлору молока: рухому паличку, *Streptococcus lactis* та нерухому “болгарську паличку” *Lactobacillus bulgaricus*, що викликають природне сквашування. Процес природного сквашування лежить в основі виробництва кисломолочних продуктів: кефіру, йогурту, ряжанки, сирів, тощо.

У забрудненому молоці міститься значна кількість представників групи кишкової палички, а також маслянокислі та гнильні бактерії. За певних умов у молоко потрапляють патогенні мікроби, що може спричинити до виникнення епідемій серед населення. Найчастіше визначають загальну кількість мікроорганізмів у молоці (мікробне число), колі-титр і пробу на редуктазу. Визначення у молоці патогенних мікробів здійснюється в спеціальних мікробіологічних лабораторіях.

Матеріали та обладнання:

Стерильна водопровідна вода, стерильні серветки, борошно, молоко, МПА, мікроскоп.

Хід роботи.

1. Для виявлення спор картопляної та сінної паличок розводять досліджуване борошно (від $1:10^2$ до $1:10^5$) у простерилізованій водопровідній воді. Суміш старанно збовтують і нагрівають на водяній бані за температури $95-97^\circ\text{C}$ упродовж 10 хв з моменту першого пухирця. При цьому вегетативні клітини бактерій гинуть, а спори залишаються живими. Висівають по 0,5-1,0 мл борошна із розведенням 10^{-3} у 2 чашки Петрі на поживні середовища МПА та Сабура та із розведенням 10^{-4} у 2 чашки Петрі на поживні середовища МПА та Сабура. Під час засіву 2 чашки Петрі із поживними середовищами МПА та Сабура залишити відкритими у “зоні стерильності”. Дослідні чашки Петрі (6 шт.) із поживним середовищем МПА розміщують у термостаті за температури 37°C на 1-3 доби, із середовищем Сабура – за температури $26-28^\circ\text{C}$ на 5-7 діб.

По закінченні інкубації оцінюють якість борошна. Для цього вивчають морфологічні й культуральні властивості мікроорганізмів, які вирости на агарових пластинках та, користуючись альбомами-визначниками, виявляють серед них картопляну і сінну палички. Підраховують кількість колоній цих спорових бактерій (при цьому беруть до уваги, що кожна колонія утворилася з однієї спори) і визначають кількість спор у 1 г борошна (число колоній множать на розведення борошна). При наявності в 1 г борошна до 200 спор якість його

вважається нормальною, якщо кількість спор є в межах від 200 до 1000 – сумнівною, а понад 1000 – таке борошно непридатне для використання.

2. Проби молока для мікробіологічних досліджень відбирають, керуючись в основному вимогами ГОСТу 9225–68. Об'єм проби молока повинен бути не меншим за 50 мл. Посуд, в який відбирають пробу, має бути стерильним. Пробу молока необхідно досліджувати зразу після її взяття. У лабораторії її треба зберігати за температури 4–6°C.

Визначення загальної кількості мікробів у молоці проводять безпосередньо підраховуючи мікроби під мікроскопом (метод Бріда). Для цього готують мазок молока, фіксують його, фарбують і вивчають під мікроскопом. При визначенні мікробного числа молока чашковим методом спочатку із відібраної проби виготовляють розведення (10^{-1} – 10^{-9}) за допомогою простерилізованої водопровідної води.

При глибинному посіві із розведень молока, які знебарвлюються резазурином до 20 хв (розведення 10^{-4} , 10^{-5} і 10^{-6}), стерильною піпеткою висівають по 0,5–1,0 мл суспензії в стерильні чашки Петрі. При знебарвленні молока резазурином більш, ніж через 20 хв роблять посів з розведень 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} у чашки і заливають розплавленим та охолодженим до 50°C МПА. Суміш обережно перемішують і розміщують у термостаті за температури 30°C. Засів можна робити на поверхню застиглому агаризованого середовища (поверхнєве культивування), а можна у стерильну чашку Петрі поміщати пробу молока та заливати поживне середовище, охолоджене до 50°C (глибинне культивування). Після триденної інкубації підраховують кількість колоній бактерій, які вирости на МПА, а на четвертий день – кількість колоній дріжджових та цвільових грибів. Потім визначають їх кількість з розрахунку на 1 мл молока.

Існує шкала оцінки якості молока за кількістю мікробів у 1 мл. До першого класу належить молоко, в 1 мл якого налічується до 500 000 мікробів, до другого – від 500 000 до 4 000 000, до третього – від 4 000 000 до 20 000 000 і до четвертого – понад 20 мільйонів. Якість молока першого класу вважається доброю, другого – задовільною, третього – сумнівною, четвертого – незадовільною.

Для оцінки засіяності молока мікробами часто використовують метод, як проба на редуктазу. Мікроорганізми молока в процесі життєдіяльності виробляють ферменти типу редуктаз, які каталізують відновні процеси в молоці. Час, необхідний для відновлення фарби-індикатора, обернено пропорційній кількості мікробів у молоці. Основна різниця між визначенням кількості мікроорганізмів на чашках Петрі та редуктазною

пробою полягає в тому, що в першому випадку визначають кількість колоній, а в другому – біохімічну активність мікрофлори молока.

Для визначення **колі-індексу** кількість бактерій групи кишкових паличок *n*, які вирости із досліджуваного об'єму молока, множать на 1000 і ділять на цей же об'єм *V*. Найменша кількість мілілітрів рідини, в якій виявляється хоча б одна клітина *E. coli*, називається **колі-титром**.

Одержані результати визначення колі-титру також дозволяють віднести молоко до якогось із чотирьох класів. Якщо колі-титр становить 10^{-1} , то таке молоко має добру якість і належить до першого класу. До другого класу відносять молоко, колі-титр якого становить 10^{-2} . Дуже забруднене молоко має колі-титр 10^{-6} і належить до четвертого класу.

Робота проводиться за трьома етапами:

На I занятті:

1. Для перевірки сировини на забрудненість бактеріальною мікрофлорою приготувати 100 мл поживного середовища МПА для стерилізації. Склад МПА (г/л): м'ясна вода (до 1,0 л), пептон ферментований – 10,0; натрію хлорид – 5,0; агар-агар – 15,0–20,0; рН=7,3.

2. Для перевірки сировини на забрудненість грибовою мікрофлорою приготувати 100 мл поживного середовища Сабуро (%): цукроза (глюкоза) – 4; пептон – 1; KH_2PO_4 – 0,05; агар-агар – 2–2,5; рН=6,5–7,0.

3. Для перевірки молока на забрудненість ентеробактеріями приготувати до стерилізації 40 мл поживного середовища Ендо (г/л): натрій хлорид – 3,4; натрій сульфід – 0,8; натрій гідрофосфат – 0,5; Д-лактоза – 10,0; фуксин основний – 0,2; агар-агар – 25,0; рН=7,2–7,6.

4. Підготувати 12 пробірок з водопровідною водою для стерилізації: 4 пробірки по 10 мл, інші – 9 мл.

5. Підготувати 12 чашок Петрі та 15 піпеток на 1 мл для стерилізації.

На II заняття принести борошно та молоко, придбане на ринку.

1. Приготувати розведення досліджуваного борошна та молока (від $1:10^3$ до $1:10^4$) у простерилізованій водопровідній воді за схемою (рис.6). Для знешкодження вегетативних клітин мікроорганізмів за вище описаною методикою необхідно нагрівати проби борошна впродовж 10 хв.

2. Розлити 100 мл поживного середовища МПА у 5 стерильних чашок Петрі по 20 мл, дотримуючись правил стерильності.

3. Розлити 100 мл поживного середовища Сабуро у 5 стерильних чашок Петрі по 20 мл, дотримуючись правил стерильності.

4. Розлити 40 мл поживного середовища Ендо у 2 стерильні чашки Петрі по 20 мл, дотримуючись правил стерильності.

5. За методикою зробити засів суспензії борошна та різних розведень молока на поживні середовища МПА, Сабуро.

6. За методикою зробити засів різних розведень молока на поживне середовище Ендо.

7. Під час засіву поживних середовищ залишити відкритими у зоні стерильності дві чашки Петрі із поживними середовищами МПА та Сабуро для попередження появи недостовірних результатів через обсіменіння з повітря.

8. Дослідні чашки Петрі перенести в термостат.

На III занятті:

1. Вивчити морфологічні й культуральні властивості мікроорганізмів, які вирости на поживних середовищах МПА, Сабуро та Ендо.

2. Підрахувати кількість колоній при всіх розведеннях на всіх живильних середовищах.

3. Виявити картопляну і сінну палички.

4. Визначити кількість спор у 1 г борошна, та у 1 мл молока.

5. Оцінити якість борошна та молока

6. Зробити висновки та оформити роботу.

Контрольні питання:

1. Які види технологічного контролю здійснюються на підприємствах біотехнологічної промисловості?

2. Опишіть методику змивів з поверхні?

3. Що передбачає контроль якості сировини?

4. Наявність яких мікроорганізмів не допускається у сировині та готових біотехнологічних продуктах?

5. Які в основному мікроорганізми контролюються у молоці та борошні?

6. Які живильні середовища застосовуються для аналізу на бактеріальне та грибне інфікування? За яких температурних умов?

7. Для чого здійснюють розведення проб сировини, наприклад молока або борошна?

8. Для чого борошно, що підлягає мікробному контролю, потребує попередньої температурної обробки?

Лабораторна робота № 15

Тема. Санітарно-гігієнічний контроль на біотехнологічних підприємствах

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

Завдання: Провеси змиви з лабораторного обладнання, підлоги, стін, стерильного посуду та з поверхні рук та висіяти їх на поживне середовище.

Теоретичні основи

Контроль апаратів й устаткування проводять безпосередньо після мийки, дезінфекції й пропарювання перед початком роботи шляхом висіву відібраних змивів для визначення загальної кількості мікроорганізмів у 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 впродовж 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 взяттям 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 та добре перемішують. Висівають 1 мл змиву на МПА. Визначають загальну кількість мікроорганізмів після термостатування за 37°C упродовж 48 год. Змив можна використати для визначення слизеутворюючих бактерій (лейконостока) висівом на спеціальні середовища. Залишок змивної рідини разом з тампоном засівають у пробірки з поплавками й 5 мл середовища Кесслер, витримують у термостаті за 43°C упродовж 18-24 год.

Застосовуючи індикаторний папір, аналіз реєструють через 12 год за 43°C. У змивах стерильного устаткування й апаратів мікроорганізми

відсутні. У добре вимитих апаратах загальна кількість мікроорганізмів та титр кишкової палички, які не повинні перевищувати їх вмісту в чистій воді, яка надходить на мийку. Кількість слизеутворюючих бактерій не повинно бути більше 0-5 в 1 мл.

Внутрішня поверхня трубопроводів, рукавів, шлангів, деяких апаратів недоступна для взятті змивів за допомогою трафарету. У цьому випадку перевірку на наявність мікроорганізмів та 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 упродовж 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-агарі. 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 на виробництві.

Контроль посуду та інвентарю. Із кожної мийної машини відбирають 5-10 вимитих пляшок 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 перерахунку на одну пляшку повинна бути не більше 300, в 1 кг промивної води – не більше, ніж у 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 тощо) мазки беруть стерильним тампоном з усією поверхні предмета й досліджують на загальну кількість визначення наявності кишкової палички. Чистоту стін й підлоги 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 та досліджують 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 на дерев'яному стрижні стерильний тампон змочують стерильною водою (або фізіологічним розчином) і протирають ним 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 проводять посів на МПА з наступним термостатування за 37°C упродовж 48 год. Залишок змиву разом з тампоном висівають у пробірки із 5 мл середовища Кесслера і вирощують 24 год за температури 43°C. Далі визначають наявність кишкових паличок методом бродильних проб.

Можна застосувати й такий метод: у складені разом кисті рук наливають 100 мл стерильної води 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 йодкрохмальним розчином (суміш рівних кількостей 6%-вого розчину КІ й 4 %-вого розчину розчинного крохмалю) і протирають окремі ділянки рук. В присутності йонів хлору тампон та протираєма ділянка рук забарвлюється в синьо-бурий колір.

Халати, куртки, фартухи, рукавички із тканини періодично досліджують на присутність кишкових паличок посівом 1 мл змивної

води в середовищі Кесслера. Кишкові палички на чистому спецодязі відсутні.

Матеріали, реактиви й устаткування:

Термостат, пробірки, вода, ватні тампони, середовище МПА, середовище Кесслер, середовище Ендо, бактеріологічні петлі, мікроскоп.

Хід роботи:

Провести аналіз лабораторного обладнання, підлоги, стін та стерильного посуду. Зробити посіви з поверхні рук.

Оформити роботу та зробити висновок.

Контрольні питання

1. Контроль у виробництві продуктів мікробного біосинтезу.
2. Види контролю, точки контролю, якість продукції.
3. Яким чином проводиться контроль апаратів та приладів?
4. Яким чином проводиться контроль трубопроводів?
5. Яким чином проводиться контроль чистоти рук працівників?
6. Товарні форми продуктів біосинтезу. Фасування, пакування, зберігання.

Рекомендована література

Основна література

1. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. Пер с англ. в 2-х частях. – М.: Мир, 1989. – 590 с.
2. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. – М: Колос, 2004. – 296 с.
3. Божков А.И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты. – Харьков: Федорко, 2008. – 364 с.
4. Векірчик К.М. Практикум з мікробіології: Навч. посібник. – К.: Либідь, 2001. – 144 с.
5. Гусев М.В. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 4-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.
6. Клещев Н.Ф. Общая промышленная биотехнология: Технология бродильных производств: Учеб. пособие / Н.Ф. Клещев, М.П. Бенько. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2007. – 200 с.
7. Лысак, В.В. Микробиология: учеб. пособие / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 426 с.
8. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
9. Сидоров Ю.І., Влезло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості (3 томи). – Львів: Видавництво Національного університету „Львівська політехніка”, 2004. – 252 с.
10. Фараджеева Е.Д., Федоров В.А. Общая технология бродильных производств. – М.: Колос, 2002. – 408 с.

Додаткова література

1. Экологическая биотехнология: Пер. с англ./ Под ред. К.Ф. Фостера, Д.А. Дж. Вейза. – Л.: Химия, 1990. – пер. изд.: Великобритания, 1987. – 384 с.
2. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология» / З.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н. Блохина и др.; Под ред. Н.С. Егорова. -М.: Высш. шк., 1989. – 668 с.
3. Кантере В.М. Теоретические основы технологии микробиологических производств. – М : Агропромиздат, 1990. – 227с.
4. Манаков М.Н., Победимский Д.Г. Теоретические основы технологии микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1990 – 227с.

5. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология: Учеб. пособие, - М.: Издво МГУ, 1989. – 294 с: ил.
6. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. – 2-е изд., перераб. И доп. - М: Агропромиздат, 1987. – 335 с.
7. Варфоломеев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов: Учеб. пособие для биол. и хим. спец. вузов. – М.: Высш. шк., 1990. – 296 с.
8. Биотехнология / М.Е. Бекер, Г.К.Лиепиньш, Е.П.Райпулис – М : Агропромиздат, 1990. – 334с.
9. Баксаньян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. – М.: Медицина, 1992.
10. Безбородов А.М. Биотехнология продуктов микробного синтеза – М.: ВО Агропромиздат», 1991. – 320 с.
11. Биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988. – 480 с, ил.
12. Биохимические основы микробиологических производств. Никитин Г.А.. Учеб. пособие. – 2-е изд., перераб. и доп. – К.: Вища шк., 1992. - 319 с.
13. Великая Е.И., Суходол В.Ф. Лабораторный практикум по курсу общей технологии бродильных производств (общие методы контроля).– 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983.– 312 с.
14. Гапонов К.П. Процессы и аппараты микробиологических производств.– М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981.– 240 с.
15. Манаков М.Н., Победимский Д.Г. Теоретические основы технологии микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1990. – 272 с.
16. Биотехнология: Биологические агенты, технология, аппаратура / У.Э. Виестур, И.А. Шмите, А.В. Жилевич. – Рига: Зинатне, 1987. – 263 с.
17. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. Для студентов институтов, аспирантов и практических работников: «Наука». – С.-Пб., 1995. – 600 с.
18. Биотехнология / М.Е. Беккер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис – М.: Агропромиздат, 1990. – 334 с.
19. Безбородов А.М. Биотехнология продуктов микробного синтеза – М.: ВО «Агропромиздат», 1991. – 320 с.
20. Биохимические основы микробиологических производств. Никитин Г.А. Учеб. пособие. – 2-е изд., перераб. и доп. – К.: Вища шк., 1992. – 319.

ЗМІСТ

Основні вимоги з техніки безпеки	3
Лабораторна робота №1. Тема. Асептика в біотехнологічній промисловості. Мікробіологічний контроль ефективності різних методів стерилізації.	4
Лабораторна робота №2. Тема. Контроль повітря виробничих приміщень біотехнологічних підприємств.	10
Лабораторна робота №3. Тема. Контроль якості води на біотехнологічних підприємствах.	13
Лабораторна робота №4. Тема. Оптимізація складу поживних середовищ для культивування промислових штамів – продуцентів біологічно активних речовин.	17
Лабораторна робота №5. Тема. Одержання чистих культур мікроорганізмів	23
Лабораторна робота №6. Тема. Визначення числа клітин мікроорганізмів висівом на поживні середовища	30
Лабораторна робота №7. Тема. Визначення біомаси культури клітин шляхом зважування	34
Лабораторна робота №8. Тема. Отримання засівного матеріалу для поверхневого і глибинного культивування промислових мікроорганізмів.	37
Лабораторна робота №9. Тема. Поверхневе та глибинне культивування промислових мікроорганізмів	46
Лабораторна робота №10. Тема. Культивування аеробних мікроорганізмів	58
Лабораторна робота №11. Тема. Культивування анаеробних мікроорганізмів	62
Лабораторна робота №12. Тема. Ріст мікроорганізмів у періодичній (статичній) культурі. Вплив умов культивування на показники росту мікроорганізмів	67
Лабораторна робота №13. Тема. Методи виділення та очищення кінцевих продуктів біотехнологічних виробництв	74
Лабораторна робота №14. Тема. Технологічний контроль на підприємствах біотехнологічної промисловості	79
Лабораторна робота №15. Тема. Санітарно-гігієнічний контроль на біотехнологічних підприємствах	86
Рекомендована література	90

Буцяк Василь Іванович

НАВЧАЛЬНЕ ВИДАННЯ

Методичні вказівки
до виконання лабораторних робіт з
дисципліни
„Загальна Біотехнологія”
для студентів денної та заочної форм навчання за
спеціальністю
162 «Біотехнології та біоінженерія»

Підписано до друку 18.08.2020 р. Формат 60x84 ^{1/16}
Папір офсетний. Тираж 100 прим.
Видавництво “Папірус”