

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

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

*кафедра біотехнології
та радіології*

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

*до виконання лабораторних робіт з дисципліни
„БІОТЕХНОЛОГІЯ”*

*для студентів денної та заочної форм навчання за освітньою
програмою “Технологія виробництва і переробки продукції
тваринництва”*

Львів – 2025

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни “Біотехнологія” для студентів денної та заочної форм навчання за освітньою програмою “Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва” розроблено на основі освітньої та робочої програм, затверджено на засіданні кафедри, протокол №22 від 25.02.2025 року та засіданні навчально-методичної комісії спеціальності 204 “Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва” факультету біолого-технологічного, протокол №6 від 28.02.2025 року.

Укладачі: д.с.-г.н., професор Буцяк В.І., асистент Кіт Н.П.

Рецензенти: завідувач кафедри годівлі тварин та технології кормів, доктор с.-г. наук, професор Півторак Я.І.

© Буцяк Василь Іванович, Кіт Н.П., 2025

Загальні положення.

Мета робочого зошита – практичне засвоєння студентами загальних принципів сучасних біотехнологічних методів, які використовуються у наукових і виробничих лабораторіях та промислових підприємствах.

Після вивчення дисципліни «Біотехнологія» студент повинен набути теоретичні знання з основних тем молекулярної біотехнології (будова ДНК, як носія спадкової інформації, плазмід, функції плазмід, вектори, вимоги до них, РНК – будова, види, функції, біосинтез нуклеїнових кислот, білків), клітинної інженерії (гібридизація і реконструкція клітин, культури клітин, поживні середовища, трансплантація ядер, трансгенні тварини), генної інженерії (методи введення ДНК у бактеріальні клітини, рестриктази і лігази, як інструменти генної інженерії, принципи конструювання векторів, утворення гібридних ДНК); ознайомитись з принципами біотехнологічного виробництва окремих засобів (вакцини, антибіотики, гормони, вітаміни, іммобілізовані ферменти, ферментні препарати, білок, незамінні амінокислоти тощо); набути практичних навиків виділення гормональних речовин, ферментів, отримання ізольованих клітин та їх культивування і клонування, отримання іммобілізованих ферментів та дослідження їх властивостей.

Робочий зошит є основним методичним посібником при виконанні лабораторних робіт з курсу біотехнології і одним із засобів контролю за самотійною роботою студентів над практичним і лекційним матеріалом. Призначений для студентів, які навчаються за напрямом підготовки 6.090102 технологія виробництва і переробки продукції тваринництва.

ПРАВИЛА РОБОТИ І ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ

1. У лабораторії можна працювати тільки в спеціальному одязі (халат, шапочка).
2. На робочому місці підтримувати чистоту і порядок.
3. Всі пляшки, флакони, колби і склянки після відбору реактиву відразу закривати корками і ставити на місце.
4. Щоб зберегти реактиви чистими, рештки невикористаної речовини не можна повертати в реактивні пляшки, флакони, колби і склянки. Реактиви загального користування не можна переносити на свої робочі місця.
5. Концентровані луги і кислоти наливати під витяжною шафою. При розбавленні концентрованих кислот завжди кислоту лити у воду, а не навпаки.
6. Пробувати реактиви на смак, а також їсти і курити в лабораторії забороняється.
7. При роботі з отруйними речовинами (спирти, ефіри, ацетон, бензол, фенол, солі важких металів та ін.) дотримуватись застережних заходів, щоб уникнути попадання їх на шкіру і слизові оболонки.
8. У випадку попадання кислоти чи лугу на руки або обличчя необхідно швидко змити їх водою і нейтралізувати (кислоту – розчином NaHCO_3 ; луг – 2% розчином борної кислоти) і повторно промити водою.
9. Після закінчення роботи злити з пробірок розчини до відповідного посуду і привести робоче місце до порядку.
10. Не можна залишати в лабораторії без догляду включені електричні прилади та газові пальники.

ТЕМА 1. КУЛЬТУРИ РОСЛИННИХ І ТВАРИННИХ КЛІТИН

Лабораторна робота №1

Тема. Приготування поживних середовищ для культивування рослинних клітин.

Мета: ознайомитись із складом поживних середовищ, освоїти техніку їх приготування та стерилізації.

Завдання: приготувати поживне середовище для індукції та росту калусної культури тютюну *Nicotiana plumbaginifolia*.

Теоретичні основи

Основою для створення поживних середовищ щодо вирощування культур тканин рослин є суміш мінеральних солей (макро- і мікроелементів), оскільки живлення культивованих тканин є гетеротрофним, джерело Карбону вводиться в склад середовища у вигляді цукрози або глюкози.

Окрім, Карбону, кисню і водню для росту тканин необхідний Нітроген у вигляді нітратної або амоніачної солі, фосфор – у вигляді фосфату, Сульфур – у вигляді сульфату та йони K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Загальна концентрація всіх мінеральних елементів найвища у середовищах Мурасіге і Скуга, Ніча, Гамборга та Шенка.

Мінеральне живлення

Нітроген. У складі більшості поживних середовищ Нітроген є у вигляді нітрату і лише в деяких середовищах (Мурасіге і Скуга, Гамборга та ін.), крім нітратів, додають солі амоніаку. Нітрати, як основне джерело азоту, вводяться в середовище в концентрації від 2,0 до 25 ммоль/л. У деяких випадках для інтенсивного росту калусних та суспензійних культур сумарну концентрацію нітрату та амоніаку можна збільшити до 60 ммоль/л. Існує чітка кореляція між збільшенням сирої маси суспензії клітин рослин і використанням нітратів із середовища, що свідчить про значне перетворення нітратів в органічні сполуки. Виявлено, що в клітинній суспензії тютюну *Nicotiana tabacum* є активна, залежна від енергії система надходження нітратів у клітини. Вона індукується нітратом і пригнічується амінокислотами. Заміна 10-20% нітратів на солі амоніаку сприяє кращому росту тканини.

Фосфор. Для росту калусних тканин та ізольованих органів необхідним компонентом є фосфор, який використовується у вигляді ортофосфату. Крім цього, джерелом фосфорного живлення можуть бути

фосфати цукрів. Йони Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} необхідні для культивування тканин у невеликих кількостях, однак вони важливу роль відіграють у процесі регулювання рН середовища. **Сульфур** вносять до складу середовища у вигляді сульфату, сульфіту, цистеїну, глутатіону або метіоніну. **Ферум** вносять у поживне середовище у вигляді неорганічних солей (FeCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) і солей органічних кислот (цитриновокисле залізо). Доцільно вводити хелатуючі реагенти, такі як етилендіамінтетраацетатна кислота (ЕДТА). Наявність цієї сполуки в середовищі покращує доступ заліза за широкого діапазону рН. Окрім основних макроелементів, до складу більшості середовищ входять мікроелементи. Внесення певної кількості мікроелементів у середовище неминуче, оскільки солі макроелементів, які використовуються, завжди містять суміші мікроелементів.

Вуглеводневе живлення. У більшості середовищ для культур рослинних тканин, джерелом Карбону, Гідрогену та енергії є цукроза або глюкоза, як правило в концентрації 20-40 г/л.

Регулятори росту. Для росту і диференціації будь-яких рослинних або тваринних клітин необхідні ауксини та цитокініни. Оскільки різні клітини і тканини в культурі значно відрізняються за здатністю до автономного синтезу та метаболізму окремих фітогормонів, тому їх ріст у значній мірі залежить від постачання екзогенних регуляторів росту. Відмінності у потребі в екзогенних ауксинах та цитокінінах дозволяють виділити декілька груп тканин:

- тканини, які ростуть на середовищі з ауксинами (експланти топінамбура, корені цикорію);
- тканин, для росту яких потрібні тільки цитокініни (культура з корінця білого турнепса);
- тканини, для росту яких необхідні ауксини і цитокініни (культивовані первинні експланти тютюну, тканини кореня моркви);
- тканини, які ростуть на середовищах складного складу;
- культури тканин пухлин, що здатні рости на середовищах без регуляторів росту.

Для отримання і підтримання культур тканин використовують: ауксини (індоліацетатну кислоту (ІОК) в концентрації 1,0-30 мг/л, α -нафтілацетатну кислоту (НОК) в концентрації 0,1-0,2 мг/л та 2,4-дихлорфеноксиацетатну кислоту (2,4-Д) у концентрації меншій, ніж 1,0 мг/л). Для індукції утворення калусу, як правило, використовують вищі концентрації ауксинів, а в процесі наступних пересадок тканина може рости при зменшеному у 10 разів вмісту ауксинів. Для росту клітин та органів рослин у культурі *in vitro* як цитокініни використовують: кінетин (Кін), 6-бензиламінопурин (БАП) та ін.

Таблиця 1. Найпоширеніші поживні середовища
для культивування рослинних клітин, тканин та органів.

Компоненти	MS	B5	WH	SH
Макроеlementи				
NH ₄ NO ₃	1650	—	—	—
KNO ₃	1900	2500	80	2500
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	—	200
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	737	400
KH ₂ PO ₄	170	—	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	134	—	—
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	—	150	19	—
(CaNO ₃) ₂ ·4H ₂ O	—	—	288	—
KCl	—	—	65	—
Na ₂ SO ₄	—	—	200	—
NH ₄ H ₂ PO ₄	—	—	—	300
Мікроelementи				
KJ	0,83	0,75	0,75	1
H ₃ BO ₃	6,3	3,0	1,5	5
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	13,2	6,65	13,2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	2,0	2,67	1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	—	0,1
MoO ₃	—	—	0,0001	—
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,0001	0,2
CoSO ₄ ·6H ₂ O	0,025	0,025	—	—
Fe ₂ (SO ₄) ₃	—	—	2,5	—
CoCl ₂ ·6H ₂ O	—	—	—	0,1
Fe-хелат				
Na ₂ ЕДТА 2H ₂ O	37,3	37,3	—	20
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	—	15

Вітаміни. Як відомо, більшість вітамінів, що входять до складу поживних середовищ, є коферментами, які каталізують різні важливі реакції. Зокрема, тіамін (вітамін В₁) входить до складу піруватдекарбоксилази, яка відіграє важливу роль у перетворенні вуглеводів, а також в окиснювальному декарбоксилюванні кетокислот. До складу поживних середовищ тіамін вводиться в кількості 0,1-10,0 мг/л. До складу багатьох середовищ входить піридоксин (вітамін В₆), який бере

участь у процесах декарбоксилювання та переамінування амінокислот. Нікотинова кислота у вигляді амідів входить до складу окиснювально-відновних ферментів – дегідрогеназ. У поживних середовищах концентрація нікотинової кислоти складає 0,5-1,0 мг/л.

Відносно стабільне значення рН у середовищі підтримується за рахунок хелатуючих реагентів або відповідних сполук. Більшість стаціонарних культур ізольованих тканин росте на середовищах з рН 5,6-5,8.

Таким чином, успіх в культивуванні культур клітин, тканин та органів рослин визначається складом поживних середовищ. На даний час розроблено багато варіантів поживних середовищ. Найбільш використовуваними поживними середовищами є наступні: Мурасіге, Скуга – МС (Murashige, Skoog, 1962), Гамборг та співробіт – В5 (Gamborg et al., 1968), Ф. Уайт – WH (White, 1963), Р. Шенк та Хільдебрант – SH (Schenk, Hildebrandt, 1972). Макро- та мікроелементи середовища МС також ідентичні до середовища LS (Linsmaier, Skoog, 1965).

Обладнання і матеріали: ламінарний бокс для стерильних робіт з вертикальним та горизонтальним потоками повітря; автоклав; рН-метр, інструменти; лабораторний посуд (хімічні склянки, чашки Петрі, колби); хімічні реактиви (NH_4NO_3 ; KNO_3 ; H_3BO_3 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KH_2PO_4 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KJ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; цукроза, вітаміни: B_1 , B_6 , PP; мезоінозит, Кін, НОК, агар-агар).

Хід роботи. Приготувати поживне середовище для індукції та росту калусної культури тютюну *Nicotiana plumbaginifolia*. З цією метою використовують модифіковане середовище МС (вміст компонентів у мг/л):

NH_4NO_3	1650	KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170	H_3BO_3	6,2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
KJ	0,83	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
B_1 (тіамін HCl)	0,1	B_6 (піридоксин HCl)	0,5
мезо-інозит	100	PP (нікотинова к-та)	0,5
Кін	0,2	НОК	2,0
цукроза	30,000	агар-агар	7500
рН	5,6 – 5,8		

Для економного використання часу та зусиль готуємо концентровані розчини макро-, мікроелементів, вітамінів, гормонів (так звані маточні розчини).

1. Приготування маточних розчинів:

а) МС₁ (маточний розчин макроелементів, де їх концентрація збільшена у 10 разів) в г на 0,5 л:

NH ₄ NO ₃	8,25
KNO ₃	9,50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,20
NaH ₂ PO ₄	0,85
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,85

Брати 100 мл маточного розчину на 1 л середовища.

б) МС₂ (маточний розчин Fe-хелат)

Солі, г	на 200 мл
Na ₂ ЕДТА·2H ₂ O	1,492
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,112

Брати 5 мл маточного розчину на 1 л середовища.

Вихідний розчин Fe-хелата (200 мл) готують, розчиняючи послідовно 1,492 г Na₂ЕДТА·2H₂O та 1,112 г FeSO₄·7H₂O та доводять до кипіння.

в) МС₃ (маточний розчин мікросолей, де їх концентрація збільшена у 100 разів).

Солі, мг на 100 мл:

H ₃ BO ₃	62,0	KJ	8,3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2,5	MnSO ₄ ·4H ₂ O	223,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	86,0		

CuSO₄·5H₂O, CoCl₂·6H₂O – зважити по 10 мг кожної солі та розчинити в 40 мл H₂O дист.; *брати 1 мл на 100 мл МС.* Брати 10 мл маточного розчину на 1 л середовища.

г) маточний розчин вітамінів

Вітаміни, мг на 100 мл,	B ₁ (тіамін HCl)	10;
B ₆ (піридоксин HCl) 50;	PP (нікотинова кислота)	50.

Брати 1 мл маточного розчину на 1 л середовища. Розчини вітамінів (1,0 і 0,1 мг/мл) готують безпосередньо розчиняючи їх в бідистиляті.

д) розчини фітогормонів	Розчини
НОК – 0,1 мг/мл	1 н NaOH
Кін – 1 мг/мл	1 н NaOH

Розчини ауксинів 2,4-Д, НОК, ІОК, ІМК та їх аналогів (наприклад, концентрацію 1 мг/мл готують, розчинивши 100 мг речовини в 0,5-2 мл

спирту, підігрівши та добавивши води до 100 мл). КІН, ЗЕА, БАП розчиняють попередньо в невеликій кількості 0,5 н НСІ і при нагріванні добавляють потрібну кількість води. Якщо у середовище необхідно внести абсцизову кислоту (гормон рослинний), то її розчиняють в 70% етанолі і доводять до потрібного об'єму. Гіберелову кислоту (входить до складу фітогормонів) розчиняють безпосередньо у воді і добавляють у поживні середовища, простерилізувавши через мембранні фільтри. Кокосове молоко добавляють у поживні середовища, попередньо підігрівши його впродовж 30 хв. за 60°C та простерилізувавши фільтруванням (діаметр мембранного фільтра складає 0,20-0,45 мкм).

Антибіотики та інші речовини, які повністю або частково розкладаються при автоклавуванні, добавляють до поживних середовищ (40-50°C) у вигляді профільтрованого (стерильного) розчину, попередньо довівши рН до 5,6-5,8.

2. Після приготування маточних розчинів приготуйте середовище: Маточні розчини на 1000 мл:

МС ₁	100 мл	МС ₂	10,0 мл
МС ₃	5 мл	Вітаміни	2,0 мл
Мезо-інозит	100 мг	Цукроза	30,0 г
НОК	1 мл	Кін	1,0 мл
рН 5,6 – 5,8			

3) Після введення в середовище всіх компонентів додайте дистильовану воду до потрібного об'єму і доведіть рН до 5,6-5,8.

4) Середовище простерилізуйте автоклавуванням 20-25 хв за 0,8-1,0 атм та 120°C.

Маточні розчини необхідно зберігати в холодильнику за температури +4°C не більше місяця. Розчин вітамінів можна заморожувати і зберігати в невеликих кількостях.

Висновки:

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

Лабораторне заняття №2

Тема. Отримання рослинних суспензійних культур.

Мета: підібрати склад поживних середовищ та штами калусної культури для отримання рослинних суспензійних культур.

Завдання: приготувати рідкі поживні середовища RMNO та RMP для культивування калусних культур з метою одержання рослинних суспензійних культур.

Теоретичні основи

Рослинні суспензійні культури складаються з поодиноких клітин і клітинних агрегатів, які ростуть в аерованому поживному середовищі певного складу. Для вирощування клітинних суспензій використовуються в основному ті ж поживні середовища, що і для калусних культур. Однак, на сьогоднішній день створені середовища, які використовуються безпосередньо для вирощування суспензійних культур, оскільки калусні та суспензійні культури значно відрізняються від кількості мінеральних солей, вітамінів, стимуляторів росту.

Суспензійну культуру можна отримувати двома шляхами: внесенням частинок раніше отриманого калусу у рідке поживне середовище; використанням експлантів тканин або стерильних проростків, які у рідкому середовищі утворюють калус. Іноколи суспензійну культуру індукують певною кількістю гомогенату тканини, що містить у своєму складі як живі, так і зруйновані клітини. Для отримання високодисперсної суспензійної культури важливе значення має тип вихідної калусної тканини. Оптимальною вважається калусна тканина пухкого типу.

Аерація культур у рідкому середовищі забезпечується такими способами:

- 1) вирощуванням кусочків калусу на мостиках із фільтрувального паперу;
- 2) культурою клітин, поміщених у рідке поживне середовище на мішалках ротаційного або шейкерного типу (накопичувальне культивування);
- 3) вирощуванням клітин у рідкому поживному середовищі в культиваторах і ферментерах шляхом барботажу або барботажу в поєднанні з механічним перемішуванням (неперервне культивування).

Основна кількість робіт, виконаних на суспензіях, присвячена вивченню їх росту та метаболізму в накопичувальній культурі. Ріст клітинної популяції в циклі вирощування накопичувальної культури виражається S-подібною кривою. Цикл росту вимірюється часом від

виходу культури в стаціонарну фазу. В процесі субкультивування клітини проходять послідовно наступні фази:

- 1) латентну або лаг-фазу; 2) експоненціальну фазу;
- 3) лінійну фазу; 4) стаціонарну фазу;
- 5) фазу загибелі клітин.

Звичайно нагромаджувальні суспензії культивують до стаціонарної фази росту, що у більшості випадків складає тривалість пасажу 21-28 днів і популяцію із 10^6 - $5 \cdot 10^6$ клітин/мл. Концентрація клітин у мл суспензії – *щільність клітинної популяції* – один із важливих показників стану клітинної системи в суспензії. Кількість клітин у мл дисоційованої суспензії визначається загальноприйнятим способом – підрахунком після нанесення на сітку лічильної камери Горяєва або Фукса-Резенталя.

Характерною особливістю суспензійних культур рослинних клітин є морфологічна і біохімічна гетерогенність. Клітинна популяція містить клітини, які відрізняються за формою та розмірами. Однією із цікавих особливостей, що виявлена при вирощуванні суспензійних культур, є залежність їх розмноження від одночасної або попередньої присутності в середовищі активних клітин, що діляться.

Індукувати поодинокі клітини до поділу можна, розташовуючи їх в контакт із калусною тканиною, що росте; посівом на тверде середовище біля кусочка тканини (тканина-нянька) або, культивуючи в середовищі, в якому раніше росла суспензія.

Ріст суспензії в значній мірі залежить від вихідної клітинної щільності інокулюму. Кожна культура має тільки їй притаманну вихідну мінімальну ефективну щільність популяції (мінімальний інокулюм, із якого можна індукувати ріст стаціонарної суспензійної культури), нижче якої значно подовжується лаг-період, або ж зовсім не спостерігається ріст.

Обладнання і матеріали: ламінарний бокс для стерильних робіт з вертикальним та горизонтальним потоками повітря; автоклав; рН-метр, інструменти; лабораторний посуд (хімічні склянки, чашки Петрі, колби); хімічні реактиви (NH_4NO_3 ; KNO_3 ; H_3BO_3 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KH_2PO_4 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KJ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; цукроза, вітаміни B_1 , B_6 , PP, мезоінозит, Кін, НОК, агар-агар), апарати для перемішування АБУ-6с, штами раніше отриманих калусних культур

Хід роботи. 1. Приготуйте рідкі поживні середовища RMNO, 4-х та RMP з половинним вмістом мікро- та макроелементів (див. табл.2).

Таблиця 2. Склад твердих поживних середовищ

Компоненти	RMO	RMOP	RMB
Макро- і мікроелементи	МС	МС	МС
Мезоінозит	100	100	100
B ₁	1	1	1
ІОК	2	-	-
БАП	0,5	1	1
НОК	-	0,1	-
Цукроза, г/1000 мл.	30	20	30
Агар, 7-8 г/л.	+	+	+
pH	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8

2. Виберіть отриману раніше калусну культуру *N. plumbaginifolia* пухкої консистенції.

3. В асептичних умовах розділіть калус на фрагменти і помістіть його в колби з рідкими поживними середовищами (див. вище).

4. Суспензію культивують в темноті при 25-26°C. на апаратах для перемішування АВУ-6с.

5. Для врахування росту суспензійних культур визначають відносний приріст сирої маси за формулою: $(W_t - W_o):(W_o \cdot 100)$, де W_o – початкова маса суспензії; W_t – маса суспензії через 21 день культивування.

6. При обробці експериментальних даних застосовують стандартні методи обробки результатів (Лакін, 1980).

Висновки:

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

Лабораторне заняття №3

Тема. Мікроклональне розмноження

Мета: ознайомитись з перевагами мікроклонального розмноження порівняно з традиційними методами розмноження.

Завдання: освоїти метод мікроклонального розмноження.

Теоретичні основи

Мікроклональне розмноження – це масове безстатеве розмноження в культурі *in vitro*, за якого отримані рослини ідентичні до вихідної батьківської форми. Від традиційних методів розмноження рослин воно відрізняється такими особливостями:

1) отриманням великої кількості копій з мінімальної кількості вихідного матеріалу; 2) отриманням, залежно від мети дослідження як генетично однорідного матеріалу, так і соматоклональних варіантів; 3) можливість відбирати *in vitro* рослинний матеріал з ознаками, що цікавлять дослідника; 4) можливість отримання безвірусного посадкового матеріалу за використанням експланта апікальних меристем та проведення при необхідності термотерапії *in vitro*; 5) можливість проводити розмноження рослин упродовж року, оскільки їх ріст та розвиток *in vitro* практично не залежать від сезонних змін. Уперше мікроклональне розмноження було здійснено Морел у роботах на орхідеї *Cymbidium*.

Увесь процес мікроклонального розмноження можна розділити на три стадії: 1) ініціація асептичної культури; 2) індукція багаточисельних пагонів за повторних пасажів на поживних середовищах; 3) підготовка сформованих *in vitro* рослин до висадки в ґрунт.

У цілому, метод мікроклонального розмноження ґрунтується на індукованому цитокінінами розростанні верхівкових і пазушних меристем, кожна з яких дає початок багатьом пагонам. Після формування багатьох пагонів їх розділяють на менші групи пагонів, переносять на свіже середовище. Швидкість мікроклонального розмноження варіює залежно від виду рослини, але часто можна отримати з єдиної бруньки декілька мільйонів рослин за рік. Основними факторами, що впливають на процес мікроклонального розмноження, є тип експланту, склад поживних середовищ та умови культивування. Вихідним матеріалом можуть бути верхівкові та пазушні меристеми стебла, молоді листки, елементи суцвіття і квітки, цибулини та бульбоцибулини. Ідеальним

матеріалом для отримання багаточисельних пагонів є апікальні та пазушні бруньки здорових рослин, що активно ростуть.

У більшості випадків для мікроклонального розмноження використовують різноманітні модифікації середовища Мурасіге-Скуга, хоча деякі групи рослин можуть мати індивідуальні потреби в поживних речовинах. Культури можуть рости на агаризованих або на рідких поживних середовищах, на мостиках із фільтрувального паперу.

Залежно від комбінацій умов культивування вихідної тканини (склад поживних середовищ, температура, світло), можна викликати розвиток пазушних бруньок, індукувати появу адвентивних бруньок або пагонів безпосередньо з клітин експланта, або калусу. Для індукції багаточисельних пагонів *in vitro* як експлант використовують верхівкові та пазушні бруньки. Окрім того широкого використання набула культура меристем.

У багатьох випадках ефективним способом розмноження *in vitro* може служити соматичний ембріогенез, тобто, процес формування зародковоподібних структур (ембріоїдів), що розвиваються із соматичної клітини і можуть дати початок цілій рослині. Соматичний ембріогенез індукують двома різними шляхами: прямим та непрямим. У ході прямого ембріогенезу соматичні зародки формуються безпосередньо в тканині експланту без проліферації калусу. Сформовані таким чином рослини ідентичні з батьківською формою. Непрямий шлях соматичного ембріогенезу пов'язаний із формуванням ембріоїдів з дедиференційованих калусних клітин та включає такі етапи: 1) індукція проембріогенної калусної маси; 2) розвиток ембріоїдів з проембріогенних клітин; 3) проростання ембріоїдів і формування рослин.

Серед рослин, що регенерували шляхом непрямого ембріогенезу, нерідко зустрічаються форми, які відрізняються від вихідних. Сомаклональні варіанти, що виникли таким чином можуть бути використані в подальшій селекційній роботі.

Обладнання і матеріали: ламінарний бокс для стерильних робіт з вертикальним та горизонтальним потоками повітря; автоклав; рН-метр, інструменти; лабораторний посуд (хімічні склянки, чашки Петрі, колби); хімічні реактиви (NH_4NO_3 ; KNO_3 ; H_3BO_3 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KH_2PO_4 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KI ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; цукроза, вітаміни B_1 , B_6 , РР, мезо-інозит, Кін, НОК, агар-агар), отримана раніше калусна культура *N. plumbaginifolia*

Хід роботи. Вегетативне розмноження *in vitro* на прикладі *N. Plumbaginifolia* проводять наступним чином. Зелені пагони тютюну розрізають на черенки довжиною 3-5 мм з однією пазушною брунькою і поміщають у пробірки або колби із середовищем МС. Для пригнічення бактеріального забруднення в культурі *in vitro* на першому етапі культивування можна вводити в склад поживних середовищ антибіотики, наприклад, клафоран. Розчин антибіотику попередньо стерилізують через мембранний фільтр і додають в поживне середовище, охолоджене до 40 °С.

Культивування проводять на світлі за температури 25-28°C. Черенки вкорінюються і дають пагони впродовж 3-4 тижнів після початку культивування. Отримані пагони можна розмножувати шляхом черенкування і вирощувати на безгормональних середовищах або середовищах, що містять низькі концентрації ауксинів (0,1-0,2 мг/л ІОК). Швидке мікроклональне розмноження включає декілька етапів.

1. Індукція адвентивних бруньок. Верхівкові та пазушні бруньки простерилізованих пагонів поміщають у колби Ерленмейєра в 5 мл рідкого поживного середовища МС, Уайта або Гамборга з бензиламінопурином (БАП) в концентрації 4-6 мг/л і культивують на світлі за 25-28°C упродовж 2-3 тижнів. Цього часу достатньо для зняття апікального домінування, що забезпечує інтенсивну проліферацію адвентивних бруньок.

2. Формування пагонів. Після 2-3 тижнів культивування експланти переносять на рідке поживне середовище того ж складу, але із зниженим вмістом БАП (до 2 мг/л). На цьому середовищі через 1,5-2,0 тижні починається інтенсивне утворення пагонів. Пасажування на свіже середовище проводять через кожні два тижні. 3. Вкорінення пагонів та формування рослин.

Сформовані пагони вицеляють із проліферуєючих експлантів та пересаджують в окремі пробірки на тверде середовище МС з низькими концентраціями ІОК (0,1-0,2 мг/л) для вкорінення. Повністю сформовані рослини висаджують у ґрунт.

Висновки:

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

Лабораторне заняття №4

Тема. Культивування тваринних клітин

Мета: ознайомитися з технікою дезагрегації тканини м'язового мішка курячого ембріону 9-11 денної інкубації та поживними середовищами, які використовуються для одержання первинно-трипсинізованих культур клітин.

Завдання: одержати первинно-трипсинізовану культуру клітин із м'язового мішка курячого ембріону 9-11 денної інкубації.

Теоретичні основи

Культура клітин – це вирощування окремих клітин або невеликих їх груп на твердих або рідких середовищах в умовах *in vitro*.

Методика культивування клітин особливо успішно стала розвиватися і удосконалюватися після 40-х років. Цьому сприяли такі обставини: відкриття антибіотиків, що запобігали бактеріальному забрудненню культур клітин, відкриття Гуангом (1943) і Ендерсом (1949) здатності вірусів викликати специфічну деструкцію клітин (цитопатичний ефект) – вигідний метод індикації вірусів у культурах клітин і, накінець, Дульбекко і Фогі (1952) запропонували методику трипсинізації тканин і одержання одношарових культур клітин.

В біотехнологічній практиці використовують такі культури клітин:

Первинно-трипсинізовані культури клітин – це клітини, виділені безпосередньо із органів і тканин організму, що ростуть *in vitro* в один шар. Таку культуру клітин можна одержати практично із будь-якого органу чи тканини тварин.

Перещеплені культури клітин – це клітини, що здатні до розмноження поза організмом довготривалий час. У лабораторних умовах ці культури підтримують шляхом пересівів із однієї посудини в іншу (при умові заміни поживного середовища).

Перещеплені клітини одержують із первинних культур клітин шляхом довготривалих пересівів. Робота триває кілька місяців. Вважають, що механізм походження перещеплених культур клітин - результат генетичної мінливості клітин або селекції поодиноких клітин, що присутні в первинній вихідній культурі. Клітини перещеплених культур мають однакову форму, гетероплоїдний набір хромосом (у первинних клітин він диплоїдний), стабільні в умовах росту *in vitro*, деякі з них володіють онкогенною активністю.

У практиці найбільш широке використання набули лінії: HeLa (із ракової пухлини шийки матки жінки); Нер-2 (карциноми гортані

людини); КВ (із ракової пухлини порожнини рота); ВНК-21 (нирка новонародженого хом'яка); ПНТ (перещеплена нирка теляти).

Диплоїдні культури клітин – це морфологічно однорідна популяція клітин, стабілізована в процесі культивування *in vitro*, що має обмежений термін життя і характеризується трьома фазами росту, зберігаючи в процесі пасажу каріотип, властивий вихідній тканині.

Диплоїдні культури клітин, як і перещеплені, одержують із первинних культур. Каріотип клітин дуже лабільний і при звичайних методах культивування змінюється в перші дні. Тому виникла необхідність розробки спеціальних методів обробки тканин, високої якості поживних середовищ, застосування фетальної сироватки для довготривалого підтримання диплоїдного каріотипу клітин *in vitro*. Це завдання вперше успішно вирішили американські вчені Гайнфлік і Мургед (1961).

Перевага диплоїдних клітин перед первинними і перещепленими полягає в тому, що 10-12 днів вони можуть зберігати життєздатність без зміни поживного середовища; вони особливо придатні для довготривалого культивування вірусів.

Хід роботи. Курячі ембріони 9-11-денної інкубації піддають овоскопії та відбирають яйця з рухливими ембріонами і добре вираженими судинами. На шкаралупі простим олівцем відзначають межі повітряної камери та розташування зародка. Поверхню шкаралупи протирають йодованим етанолом та обпалюють. Стерильними ножицями зрізають шкаралупу на 2-3 мм вище межі повітряної камери, розривають підшкаралупну і хоріоалантоїсну оболонку. Переносять ембріон у чашку Петрі, видаляють головку, крила, ніжки та внутрішні органи. Шкірно-м'язовий мішок, що залишився, подрібнюють і 2-3 рази відмивають розчином Генкса від кров'яних елементів, слизі та переносять у колбу для трипсинізації. Додають 0,15%-ний розчин трипсину, підігрітого до 35-37°C (у співвідношенні тканини і трипсину 1:3), ставлять на магнітну мішалку.

Трипсинізацію ведуть поетапно, тобто через кожні 3-5 хвилин, від'єднані клітини разом з трипсином зливають у центрифужні пробірки на льоді (для припинення дії трипсину на клітини). До залишку в колбі додають нову порцію трипсину. Процес ведуть до повного розчинення тканини. Після трипсинізації суспензію клітин у розчині трипсину центрифугують 20 хвилин за 1000 об/хв, надосадову рідину зливають, а осад клітин ресуспендують у поживному середовищі (37°C) і фільтрують через 3-шаровий марлевий фільтр.

Після перемішування беруть 1 мл клітин для підрахунку. Успіх культивування клітин залежить від посівної дози. За малої кількості клітин не спостерігається утворення моношару, навіть при довготривалому культивуванні. За дуже великої кількості клітин проходить інтенсивна їх проліферація, і утворений шар клітин значно раніше піддається старінню та неспецифічній дегенерації. Підрахунок клітин проводять у камері Горяєва.

До 1 мл суспензії клітин додають 1 мл 0,1%-ного розчину кристалвіолету, приготованого на 0,1 N розчині цитринової кислоти. Після перемішування камеру заповнюють та проводять підрахунок всіх клітин, що мають ядро і неушкоджену цитоплазму. Після підрахунку клітин розводять поживним середовищем так, щоб в 1 мл містилося від 700 тисяч до 1 млн. клітин.

Найбільш доступним та простим методом консервування культур клітин є зберігання їх за 4°C.

Розчини і поживні середовища, що використовуються в роботі з культурами клітин.

Розчин Генкса: в 1 л бідистильованої води (в грамах): 8,0 NaCl; 0,4 KCl; 0,1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,14 CaCl_2 ; 0,06 KH_2PO_4 ; 0,06 Na_2HPO_4 ; 1,0 глюкози; 0,02 фенолроту; 0,07 NaHCO_3 .

Розчин Ерла: в 1 л бідистильованої води (в грамах): 6,8 NaCl; 0,4 KCl; 4,1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 CaCl_2 ; 0,125 NaH_2PO_4 ; 2,2 NaHCO_3 ; 1,0 глюкози.

Ці сольові розчини використовують для приготування всіх поживних середовищ, оскільки вони забезпечують стабільність рН, осмотичний тиск у клітинах і необхідну концентрацію неорганічних речовин. Зараз у біотехнологічній практиці найбільш широке використання набули середовище 199 та Ігла. До їх складу входить більше 60 компонентів: 20 амінокислот, 17 вітамінів, компоненти нуклеїнових кислот, джерела ліпідів, 8 мінеральних солей. Для пригнічення росту грибів використовують натрієву сіль ністатину по 100 мкг на 1 мл середовища.

Якщо поживне середовище використовують як ростове, що забезпечує життя і розмноження клітин, то вводиться сироватка крові з кінцевою концентрацією 2-10%.

Висновки:

Контрольні питання.

1. Яка особливість в будові еукаріотичних клітин?

2. Яка особливість в будові прокаріотичних клітин?

3. Що таке культура клітин?

4. Які переваги культур клітин над тканинними культурами?

5. Що таке клітинна лінія?

6. Що таке клітинний штам?

7. Що таке клітинний цикл, як він поділяється?

8. Які процеси відбуваються в G_1 -період клітинного циклу?

9. Які процеси відбуваються в S-період клітинного циклу?

10. Які процеси відбуваються в G_2 -період клітинного циклу?

11. Які є основні органоїди в клітині?

12. Яка особливість перещеплених культур клітин?

13. Які є методи дезагрегації тканин для отримання клітин?

14. Як поділяються культури клітин за їх здатності прикріплення до субстрату?

15. Які стадії проходять клітини в процесі інкубації?

16. Які основні компоненти поживного середовищ для культивування клітин?

17. Для чого необхідно синхронізувати клітини в культурі клітин?

18. В чому суть селективного методу синхронізації клітин?

19. В чому суть індукованого методу синхронізації клітин?

20. Загальні принципи створення поживних середовищ для культивування рослинних тканин.

21. Мінеральне та вуглеводневе живлення як необхідна умова росту рослинних тканин поза материнським організмом в умова *in vitro*.

22. Використання фітогормонів для росту та диференціації рослинних клітин.

23. Вітаміни як складові компоненти поживних середовищ.

24. Вплив умов культивування на ріст культур тканин.

25. Характеристика рослинних суспензійних культур та можливі галузі їх застосування.

26. Способи отримання клітинних суспензій.

27. Фактори, що впливають на ріст суспензійних культур.

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

ТЕМА 2. ОДЕРЖАННЯ ГОНАДОТРОПІНУ ТА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ЕМБРІОНІВ

Лабораторне заняття №5

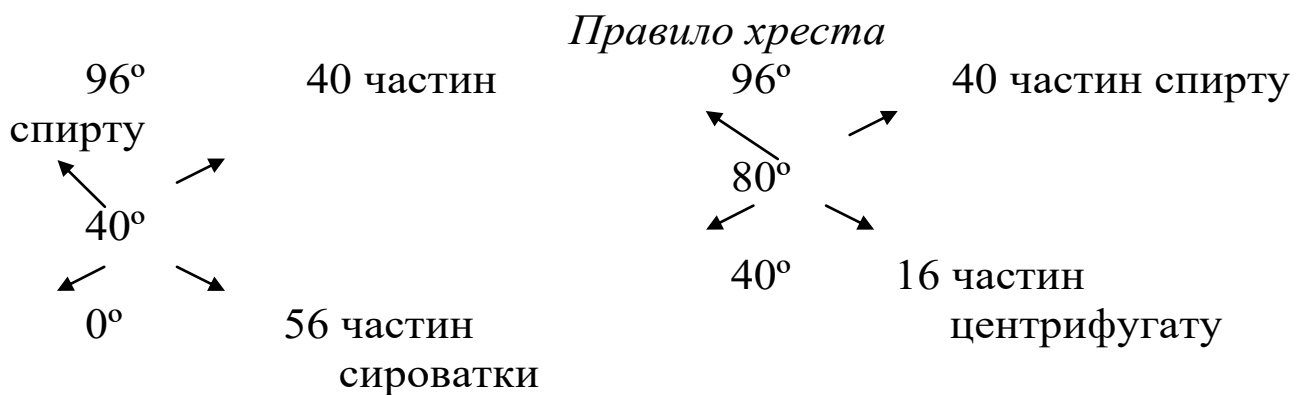
Тема. Одержання гонадотропіну із сироватки жеребної кобили

Мета: ознайомитись з процесом одержання гонадотропіну в лабораторних умовах.

Завдання: одержати порошок гонадотропіну із сироватки жеребної кобили.

Теоретичні основи

Гонадотропіни синтезуються базофільними клітинами передньої долі гіпофізу. До цих гормонів відносяться фолікулостимулюючий (ФСГ, фолітропін) і лютеїнізуючий (ЛГ, лютропін). Ці гормони є складними білками – глікопротеїнами. ФСГ викликає дозрівання фолікулів в яєчниках у самок і сперматогенез у самців. ЛГ у самок стимулює секрецію естрогенів і прогестерону, а також розрив фолікулів з утворенням жовтого тіла, а у самців – секрецію тестостерону.



Хід роботи. Осадження альбумінів і глобулінів. До 10 мл сироватки або плазми крові поступово (впродовж 15-20 хвилин) додати декілька мілілітрів 50% розчину ацетатної кислоти до рН-4,5. При цьому слід постійно проводити помішування з допомогою скляної палички. Значення рН перевіряють універсальним індикаторним папірцем (можна також з допомогою рН-метра). Після досягнення значення рН у межах $4,5 \pm 0,2$ до сироватки (плазми) крові поступово перемішуючи додати охолоджений ($0-2^{\circ}\text{C}$) спирт до 40° концентрації (на 10 мл сироватки чи плазми крові необхідно додати приблизно 7 мл). При визначенні необхідного об'єму спирту слід користуватись правилом хреста, Осадження альбумінів і

глобулінів проводити через 10 хвилин шляхом фільтрування або центрифугування впродовж 10 хвилин при 2-3 тис. об./хв.

Осадження гонадотропінів. Після фільтрування або центрифугування слід заміряти об'єм фільтрату (цетрифугату) з допомогою мірного циліндра. Фільтрат (центрифугат) переносять у ділильну лійку об'ємом 100-150 мл. Перемішуючи скляною паличкою додають охолоджений спирт до концентрації 80°. Об'єм спирту підраховують аналогічно, як за осадження альбумінів і глобулінів. Концентрацію спирту також можна вимірювати з допомогою спиртометра. Додавання спирту слід проводити поступово впродовж 10-15 хвилин. Через 1,0-1,5 години після додавання спирту наступить випадання осаду гонадотропінів. Повне осадження гонадотропінів настає через 10-12 годин. Після того як випаде осад гонадотропінів слід провести сифонування (відділення та збирання) верхньої прозорої частини з допомогою гумового шлангу, а нижню частину через краник ділильної лійки вилити у склянку і провести фільтрування або центрифугування впродовж 10 хвилин за 2-3 тис. об./хв.

Одержання порошку гонадотропінів. До осаду в пробірках додати 5 мл ацетону і перемішати скляною паличкою, після чого процентрифугувати (10 хвилин за 2-3 тис. об./хв). Цю процедуру слід повторити ще 2 рази. Залишки ацетону в пробірці над осадом гонадотропінів висушують на повітрі. За наявності ліофільної сушки проводять висушування гонадотропінів. До осаду гонадотропінів додають дистильовану воду, отриманий розчин переносять у целофановий мішочок для діалізу. Процес триває 10-12 годин. Після цього діалізат піддають ліофільній сушці. Вихід гонадотропінів з 10 мл сироватки (плазми) складає 10-15 мг.

Висновки:

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

Лабораторне заняття №6

Тема. Одержання і трансплантація ембріонів.

Мета: ознайомитися з репродуктивною трансплантацією організмів.

Завдання: вивчити технологію одержання, проведення морфологічної оцінки якості ембріонів, кріоконсервацію та їх трансплантацію.

Теоретичні основи

Технологія одержання і трансплантація ембріонів включає відбір та підготовку донорів ембріонів, гормональне викликання суперовуляції, осіменіння корів-донорів, одержання ембріонів, короткотривале зберігання, культивування або глибоке заморожування ембріонів, відбір реципієнтів і їх синхронізацію за естральним циклом з донором, пересадку ембріонів та контроль результатів.

Враховуючи високу вартість виконання робіт щодо пересадки ембріонів, оціночні критерії тварин (донора і реципієнта) повинні бути об'єктивними. Донор – це тварина (корова чи телиця) з високою племінною цінністю, від якої, після гормонального стимуляції поліовуляції та осіменіння спермою елітних биків одержують ембріони. Реципієнт – телиця чи корова, якій трансплантують в матку ембріони. Кращими реципієнтами є молоді корови доброго екстер'єру з регулярним статевим циклом. Для викликання суперовуляції найчастіше використовується наступна схема гормональної обробки (табл.3).

Таблиця 3. Схема гормональної обробки щодо викликання суперовуляції.

День естрального циклу	Назва препарату	Доза
2	Вітамін А	150 000 МО
	Вітамін Е	100 мг
	Калія йодид	100-200 мг
10-12	ГСЖК	2500-3000 МО
	Вітамін А	75 000 МО
	Вітамін Е	50 мг
12-14	Простагландин	0,5-30 мг
14-16	Охота і осіменіння	
21-23	Одержання ембріонів	

Хід роботи. Для вимивання ембріонів використовують двоканальний (пластиковий) катетр, який складається з трубки, яка на кінці має

надувний балончик і шість отворів, що забезпечують оптимальну поверхню введення і виведення промивного середовища. Зовнішній кінець гумової трубки – конусоподібний, розширений, куди вставляють металічний перехідник, що має замковий вузол для фіксації стилету в гумовій трубці.

Для приведення в робочий стан пристрою у зовнішній конусоподібний кінець гумової трубки вставляють перехідник. Через нього вводять металічний стилет і фіксують у перехіднику. Перед роботою складові частини стерилізують. Гумові компоненти стерилізують холодним способом 80° спиртом упродовж 1,5-2,0 годин. Катетр у зібраному вигляді змазують стерильним вазеліновим маслом і зберігають в поліетиленовому пакеті.

Вимивають ембріони на 7-8 день від початку охоти. Тварину фіксують в станку, звільняють пряму кишку від вмістимого. Зовнішні статеві органи миють водою з милом, дезинфікують. Для зняття напруження прямої кишки проводять сакральну анестезію 2%-ним розчином новокаїну (5 мл). Катетр вводять в піхву і обережно (при ректальному контролі) через шийку матки в один із рогів. Стилет поступово видаляють по мірі руху катетра в розі. Видаливши стилет, у балончик нагнітають 10-15 см³ повітря, до дистального кінця за допомогою трійника приєднують систему шлангів. До вільного кінця одного із шлангів вставляють голку і сполучають з флакончиком, що містить промивне середовище, а другий шланг опускають в мірний циліндр об'ємом 500 мл. Подача в катетр промивної рідини здійснюється за допомогою шприца чи самотоком.

Надходження промивної рідини із флакону або шприца і її відтік із рогу матки регулюють відповідними затискувачами. Для більшого видалення промивної рідини обережно ректально проводять маніпуляцію з рогом матки – масаж та підняття верхівки рога. Як промивне середовище використовують розчин Дюльбекко. На промивання одного рогу витрачають 500 мл. Розчин у ріг матки подають і видаляють порціями по 50-60 мл. Після закінчення промивки одного рогу видаляють повітря з балончика. Для промивання другого рогу беруть інший катетр і в тій же послідовності повторюють процедуру вимивання ембріонів. Після вимивання в матку вводять суміш антибіотиків (пеніцилін + стрептоміцин по 500 тис. МО в 20 мл 0,5%-ного розчину новокаїну).

Морфологічна оцінка якості ембріонів. Оцінку проводять під мікроскопом за 100-160 кратному збільшенні. Предметне скло обережно нахиляють з метою огляду ембріону з усіх сторін. Придатними для трансплантації є ембріони, одержані на 7-8 день після осіменіння. До

цього часу нормально розвинені ембріони знаходяться в стадії пізньої морули, ранньої і пізньої бластоцисти. За оцінки якості необхідно враховувати: стадію розвитку ембріона і відповідність його віку, стан клітинної маси і оболонки, характер зв'язку між бластомерами, прозорість перивітелінового простору. Незаплідненні яйцеклітин мають форму правильної сфери, прозорий перивітеліновий простір, гомогенний розподіл цитоплазматичних тілець.

Ембріони з частковою дегенерацією характеризуються несиметричним розташуванням бластомерів, різною їх величиною, наявністю в перивітеліновому просторі гранул, включень. У морул спостерігається часткове руйнування бластомерів, відсутність ділення окремих, наявність двох-трьох загиблих бластомерів. У бластоцист часто проглядається збільшення перивітелінового простору, часткове руйнування клітин трофобласту. Прозора оболонка має невеликі тріщини. Дегенеровані ембріони на 3-4 ділення відстають від нормального розвитку. Вони характеризуються розпадом бластомерів, зміною або фрагментацією цитоплазми, видимі значні тріщини прозорої оболонки.

Нормально розвинені ембріони містять непошкоджені рівномірно по ширині опалесциючі оболонки і цитоплазму в стані дроблення, відповідно віку ембріона. Морула – це скупчення бластомерів не завжди однакових за розміром через асинхронність дроблення. Цитоплазма гомогенна, бластомери мають полігональний зв'язок. Перивітеліновий простір вільний від гранул і включень.

У ранньої бластоцисти добре диференційовані клітини: на трофобластичні і ембріобластичні. Перивітеліновий простір вузький, прозора оболонка, як і в попередній стадії, має товщину до 15 мкм. Пізня 8-добова бластоциста характеризується наявністю великої порожнини, що займає весь перивітеліновий простір. Клітини трофобласту добре диференційовані від ембріобласту. Прозора оболонка потовщена, розтягнута. В цілому оцінка ембріонів здійснюється за 5-ти бальною шкалою (табл.4):

Таблиця 4. Оцінка ембріонів.

Оцінка	Бали	Умовне позначення
відмінно	5	++
добре	4	+
задовільно	3	+ -
умовно придатні	2	+ - -
непридатні	1	- -

Короткотермінове зберігання і культивування ембріонів.
Маніпуляції з ембріонами від моменту їх одержання до пересадки чи

глибокого заморожування займають від 1 до 5 годин. Упродовж цього періоду необхідно створити умови, які забезпечують збереження життєздатності ембріонів. Для короткочасного зберігання використовують розчин Дюльбекко з додаванням пеніциліну 100 ОД на 1 мл і 20% сироватки крові (телят). Ембріони, що знаходяться на годинниковому склі в 0,5 мл поживного середовища переносять в чашку Петрі, дно якої вкрите зволоженим фільтрувальним папером та зберігають в термостаті за 37°C.

Культивування ембріонів дає змогу зберегти життєздатність їх до пересадки впродовж 24-48 годин, а також уточнити придатність для пересадки у сумнівних випадках. Для культивування найчастіше використовують середовище Дюльбекко з використанням 20-30% сироватки крові та пеніциліну 100 ОД/мл. Культивування можна проводити в 0,2 мл поживного середовища на годинниковому склі під шаром стерильного вазелінової олії (25 крапель). Годинникові скельця розміщують у чашках Петрі і зберігають в ексікаторі за 37°C. Через ексікатор до початку та під час культивування для підтримки оптимальних умов пропускають зволожену газову суміш, що складається з азоту (90%), кисню (5%) і вуглекислого газу (5%).

Після культивування ембріонів проводять оцінку їх життєздатності під мікроскопом. Ембріони, що пройшли розвиток відповідно до очікуваної стадії та одержали за морфологічними показниками оцінку 5; 4 чи 3 бали, вважають придатними для пересадки.

Кріоконсервація ембріонів. Глибоке заморожування ембріонів та зберігання їх в рідкому азоті за температури -196°C забезпечує довготривале зберігання їх життєздатності і проведення трансплантації у зручний час.

Заморожування ембріонів проводять за допомогою автоматичного програмного приладу, який складається з 3-х основних частин: електронного блоку, камери для заморожування і ємкості з рідким азотом.

Для заморожування використовують лише свіжоодержані ембріони відмінної і доброї якості. Захист ембріонів від руйнування при заморожуванні та розморожуванні здійснюють шляхом використання кріозахисних речовин (кріопротекторів): легко проникаючий у клітину гліцерол у концентрації 1,0-1,4 М. Розчин гліцеролу готують на фосфатно-сольовому буфері (ФБС), який містить 100 тис. ОД/л пеніциліну і 20% сироватки крові, починаючи з більш високих концентрацій.

Таблиця 5. Схема виготовлення розчинів гліцеролу.

Концентрація кріопротектора	Співвідношення компонентів
-----------------------------	----------------------------

1,0 М	0,74 мл 1,0 М р-ну гліцеролу + 9,26 мл ФБС
0,75 М	1 мл 1,0 М р-ну гліцеролу + 0,5 мл ФБС
0,5 М	2 мл 1,0 М р-ну гліцеролу + 2 мл ФБС
0,25 М	1 мл 0,5 М р-ну гліцеролу + 1 мл ФБС

Перед заморожуванням ембріони послідовно поміщають у розчини кріопротектора із збільшенням концентрації. Проводку ембріонів через ряд послідовних концентрацій здійснюють під мікроскопічним контролем.

Після витримки в останньому розчині кріопротектора ембріони готові до заморожування, їх переносять у спеціальні ємкості. Це найчастіше скляні ампули. В кожену ампулу поміщають 1-4 ембріони в 0,3-0,4 мл розчину кріопротектора. Ампули запаюють газовим пальником.

Таблиця 6. Система насичення ембріонів гліцеролом.

Номер розчину	Концентрація гліцеролу	Витримка (хвилин)
1	0,25 М	5
2	0,50 М	5
3	0,75 М	5
4	1,00 М	10

Процес заморожування проходить в декілька етапів. Ампули з ембріонами переносять у камеру для заморожування та проводять охолодження від +20°C до +6°C зі швидкістю 1°C/хв. Далі зниження температури проводять 0,3°C/хв до -35°C і переносять ембріони в рідкий азот. Для ємкості (ембріобанки) найбільш зручною є посудина Дюара.

Розморозжування ембріонів і підготовка їх до пересадки. Розморозжування ембріонів проводять у водяній ванні за +25°C. Ампулу швидко витягують з посудини Дюара та переносять у водяну ванну. Витримують там 10-12 секунд, повільно перемішуючи маятникоподібним рухом.

Розморожені ембріони разом з середовищем, в якому вони знаходилися у замороженому стані, переносять на годинникове скло і проводять попередню морфологічну оцінку.

Після промивки оцінюють життєздатність ембріонів під мікроскопом за морфологічними ознаками.

Таблиця 7. Відмивка ембріонів від кріопротектора.

Номер розчину	Концентрація гліцеролу	Тривалість (хвилин)
---------------	------------------------	---------------------

1	1,00 М	10
2	0,75 М	5
3	0,50 М	5
4	0,25 М	5
5	Середовище ФБС	10-20

Пересадка ембріонів. Пересадку ембріонів без хірургічного втручання проводять за допомогою спеціальних катетерів, які стерилізують та витримують у боксі впродовж 30 хвилин під бактерицидними лампами.

Підготовку реципієнтів до пересадки ембріонів здійснюють подібно до донорів. Катетер вводять обережно, під ректальним контролем, ближче до верхівки рогу матки і виштовхують вміст шприцом у просвіт рогу матки. Прилад обережно виймають із статевих шляхів та піддають дезинфекції. Після пересадки ембріонів проводять контроль на можливість прояви повторної охоти. На 60-90 день тварин досліджують на наявність тільності методом ректальної пальпації.

Висновки:

Контрольні питання.

1. Що таке клонування клітин?

2. Що таке клонування організмів?

3. Які властивості характерні для стовбурових клітин?

4. Що таке репродуктивне клонування?

5. В чому суть репродуктивного клонування організмів?

6. Які два типи клітин необхідні для здійснення репродуктивного клонування?

7. Який організм вперше клоновано?

8. Які види ссавців є клоновані?

9. Для чого необхідні пухлинні клітини при створенні гібридом що продукують моноклональні антитіла?

10. Для чого необхідні лімфоцити при створенні гібридом що продукують моноклональні антитіла?

11. Чому аміноптерин не пригнічує росту лімфоцитів в культурі клітин?

12. Який ензим дозволяє лімфоцитам синтезувати нуклеїнові кислоти “обхідним шляхом”?

13. Чому аміноптерин пригнічує ріст пухлинних клітин в культурі клітин?

14. Чому в селективному середовищі ГАТ немає речовин, які блокують життєвоважливі метаболічні шляхи в лімфоцитів?

15. Чому в селективному середовищі ГАТ є речовин, які блокують життєвоважливі метаболічні шляхи в пухлинних клітинах?

16. Роль тимідину як компонента селективного середовища ГАТ.

17. Роль гіпоксантину як компонента селективного середовища ГАТ.

18. Біологічний методи гібридизації клітин.

19. Хімічний метод гібридизації клітин.

20. Які основні етапи отримання моноклональних антитіл?

21. Де використовують моноклональні антитіла?

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

ТЕМА 3. МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ОДЕРЖАННЯ МОНОЗИГОТНИХ І ХИМЕРНИХ ТВАРИН

Лабораторне заняття №7

Тема. Одержання монозиготних близнят та химерних тварин методами біотехнології.

Мета: ознайомлення з методами, які дають можливість одержання монозиготних близнят від високопродуктивних тварин та поєднати в одній тварині корисні господарські ознаки різних порід.

Завдання: в лабораторних умовах одержати монозиготних близнят та химерних тварин.

Теоретичні основи

Монозиготні (однойцеві, ідентичні) близнята – це близнята, які розвиваються з однієї заплідненої яйцеклітини (зиготи) при поділі її під час першого дроблення. Перші стадії дроблення зигот ссавців відбуваються за кратними числами з більш або менш однаковими за величиною бластомерами, які відрізняються округлою формою і малою диференціацією. З кожним новим поділом бластомери стають дрібнішими. Оскільки ріст, який характерний для поділу соматичних клітин, при дробленні не спостерігається. У бластомерів порушується ядерно-цитоплазматичне співвідношення – ядра, завдяки мітозу, зберігають свій об'єм, а цитоплазма з кожним черговим поділом зменшується вдвоє.

Пізніше, вже на стадії восьми бластомерів, помітна відмінність у їхніх розмірах (великі, темні – зародкові і малі, світлі – зовнішньозародкові). Починаючи з цієї стадії, дроблення стає асинхронним, тобто різні бластомери дробляться не однаково. Світлі діляться швидше, а темні – повільніше. Після того як бластомери, що діляться, утворюють щільну групу клітин (16-32) зародок перетворюється в ранню морулу, що буває на 4-5 добу після запліднення. Через 5-7 діб зародок – це вже є клітинний комплекс з 32-90 бластомерів, що називається пізньою морулою. Коли клітини морули починають виробляти рідину і перегруповуватися навколо центральної наповненої рідиною порожнини, то утворюється бластоциста на 7-8 добу.

Хід роботи. Одержання монозиготних близнят методами біотехнології збільшує вихід телят від одного донора. Для вирішення цього завдання розроблено мікрохірургічні операції на ембріонах, а саме:

Видалення зони пеллюціда ембріонів і бластомерів, функція якої в період раннього розвитку ембріона полягає в тому, щоб не допустити розсіпання бластомерів і безпосереднього контакту з другими ембріонами та сторонніми клітинами (лейкоцитами і сперматозоїдами). Видалення зони пеллюціда проводять двома методами: а) мікрохірургічним – за допомогою мікроножів; б) ензиматичним – інкубують в присутності протеолітичного ферменту.

Розділення бластомерів. Розділення проводять тоненькою голкою і гачком. Для нормального розвитку ембріонів раннього віку *in vivo* необхідна зона пеллюціда. Для захисту ембріонів з порушеною зоною пеллюціда англійський вчений Вілладсен (1979 рік) використав агар. Агар практично не розчинний у статевих шляхах самки і закупорює будь-які отвори в зоні пеллюціда, що дає можливість ембріональним клітинам вижити і розвиватися *in vivo*. Вілладсен опрацював техніку укладання ембріонів з порушеною зоною пеллюціда в агар. Зону пеллюціда видаляють і бластомери відділяють з групи клітин або розділяють. Виділені бластомери ін'єкують у порожню зону пеллюціда. Після заповнення перивітелінового простору сироваткою крові вівці, ембріони вводять у невеликий циліндр з агару, який поміщають у ще більший циліндр. Останній вводять у яйцепровід вівці з лігатурою до утворення ранньої бластоцисти. Потім агаровий циліндр виймають, ембріони звільняють з нього і пересаджують реципієнту.

При укладанні ембріона в агар він повинен бути повністю покритий ним так, щоб вільно переміщувались клітини всередині ембріона в період розвитку і взаємодії між собою. Циліндр з агару має бути невеликим за об'ємом, стійким до руйнування, тобто таким, щоб його можна було б легко ввести у яйцепровід.

В яйцепроводі вівці створюються сприятливі умови для розвитку ембріонів корови і свині, аж до стадії бластоцисти. Тому яйцепровід вівці з лігатурою використовують як стандартну схему для культивування мікроманіпульованих ембріонів усіх видів домашніх тварин. З цією метою може бути використаний яйцепровід анестральної вівці і не обов'язково використовувати овець з синхронізованою охотою як донора.

Вілладсен експериментально довів, що поодинокі бластомери з 2-клітинного ембріона мають потенціальні можливості розвитку і з них можна отримати нащадків.

У овець 2-клітинні ембріони можна отримати лише впродовж дуже короткого часу – біля 48 годин після запліднення, а через 60

годин більшість ембріонів знаходиться на 4-клітинній стадії розвитку. Наступні експерименти Вілладсена (1980) показали, що однакові двійнята можна одержати з 4- і 8-клітинних ембріонів шляхом розділення бластомерів на групи. “Половинки” з 2-, 4- і 8-клітинних ембріонів є однаково життєздатними порівнюючи з нормальними ембріонами овець, їх можна зберігати у замороженому стані, що і було використано Вілладсеном при одержанні монозиготних двійнят. Виживання “четвертинок” ембріонів, одержаних шляхом розділення 4-клітинних ембріонів на окремі клітини або 8-клітинних ембріонів на 4 пари клітин, дещо нижче, ніж у нормальних.

Виживання ембріонів одержаних з окремих бластомерів 8-клітинних ембріонів майже нульове. Зниження виживання, очевидно пов'язане із зменшенням числа клітин у таких ембріонів під час бластуляції, що призводить до утворення дермальних міхурців у більшій кількості, порівняно з нормальною бластоцистою.

З практичної точки зору більш доцільним є одержання ембріонів у корів нехірургічним методом, тому ряд досліджень проведено на 5-6 денних ембріонах на стадії морули. Ембріони були розділені на “половинки” або “четвертинки”, розміщені в зону пеллюціда, укладені в агар і пересаджені в яйцепровід з лігатурою анестральної вівці на 1-2 доби. Потім їх виймали і пересаджували хірургічним способом реципієнтам на 6-й і 7-й день статевого циклу. Приживання “половинок” ембріонів складало 75% і не відрізнялось від проведеної пересадки інтактних ембріонів. Приживання “четвертинок” ембріонів складало 41% і було значно нижчим порівняно з пересадкою інтактних ембріонів корів. Ці спостереження дають можливість зробити висновок про здатність розділених ембріонів корів регулювати свій розвиток при зменшенні кількості клітин навіть на стадії компактизованої морули.

Розділені ембріони корів можуть зберігатись у замороженому стані. Після виймання з яйцепроводу з лігатурою вівці розділені (поділені) ембріони корів на стадії ранньої бластоцисти або пізньої морули Вілладсен заморожував і потім пересаджував реципієнтам. Після пересаджування поодиноких половинок приживалось 50% ембріонів, а після пересадки 2 половинок ембріонів – 67%, не спостерігалось при цьому приживання “четвертинок” ембріонів підданих заморожуванню.

Ембріони корови на пізніших стадіях розвитку можна успішно використовувати для одержання однояйцевих близнят при вилученні ембріонів нехірургічним способом. У даний час у багатьох комерційних фірмах і науково-дослідних лабораторіях розділяють морули (біля 64

клітин), так і бластоцити (до 256 клітин) на дві половинки, кожна з яких містить однакове число клітин.

Розроблена техніка розділення і для 6-денних ембріонів свиней (Рорі, 1985). Скляною голкою розрізають внутрішню клітинну масу ембріона і приблизно 40% зони пеллюціда. Потім розрізають шар трофектодерми всередині зони пеллюціда. Одну половинку ембріону у власній зоні пеллюціда, а другу без неї пересаджують у 8-денному віці в ріг матки реципієнта на віддалі 5 см від матково-трубного з'єднання. Після пересадки половинок з 8 ембріонів одержано 4 живих поросят.

Одержання химерних тварин. Химерні тварини (генетичні мозаїки) – мозаїчні тварини, в яких різні групи клітин походять не від однієї, а від кількох зигот.

Одержують їх двома методами:

Агрегаційний метод. Цей метод ґрунтується на злитті цілих ембріонів під час культивування.

Ін'єкційний метод. Він полягає у пересаджуванні клітин від іншого ембріона або соматичних клітин однієї особини в бластоцельну порожнину іншого ембріона. В такий спосіб одержують ін'єкційні химери.

Метод добування химер злиттям ембріонів, які відрізняються за генотипом, було розроблено польським ембріологом А.Тарковським у 1961 році. Суть його полягає в тому, що 8-клітинні ембріони інкубують у присутності протеолітичного ферменту, в результаті чого у них лізуються оболонки і зародки зливаються. Після чого їх трансплантують тварині-реципієнту. Народжені тварини-химери поєднують у собі ознаки обох ембріонів, тобто є нащадками чотирьох батьків.

Химер одержують пересаджуванням клітин з допомогою спеціальних знарядь. Зону пеллюціда ембріона розрізають мікроножем. Виймають ембріони тоненькою голкою і гачком. Далі батьківські ембріони поділяють на дві половини. Половини різних ембріонів об'єднують і поміщають в порожню зону пеллюціда. В одну зону пеллюціда можна вводити чотири половини двох батьківських ембріонів. Добуті таким чином ембріони-химери вводять у матку реципієнта. Як показник химеризму використовують колір масті новонароджених. У 1983 році групою С.Вілладсена одержано перші міжвидові химери сільськогосподарських тварин в результаті об'єднання клітин ембріонів вівці та кози. Вівцекоза поєднує в собі ознаки обох видів.

Химерні тварини не передають нащадкам ознак мозаїчності, оскільки відбувається розщеплення. Незважаючи на це, стосовно до сільськогосподарських тварин формування химер може послужити меті

поєднання в одній тварині корисних ознак різних порід і сприятиме виведенню нових порід і породних груп тварин.

Висновки:

Контрольні питання.

1. Одержання монозиготних близнят дає можливість...._____
2. Якими методами проводять віділення зони пелюциду?_____
3. Для захисту ембріонів із пошкодженою зоною пеллюцида Віллансен використав агар, який володіє наступними властивостями:_____
4. При укладці ембріона в агар, він повинен бути повністю..._____
5. Що таке химерні тварини?_____
6. Якими методами одержують химерні тварини?_____
7. Ким і коли одержані перші міжвидові химери сільськогосподарських тварин?_____
8. Яке значення має використання химер у сільському господарстві?_____
9. З яких пуринових нуклеотидів побудована молекула ДНК?_____
10. З яких піримідинових нуклеотидів побудована молекула ДНК?_____
11. З яких пуринових нуклеотидів побудована молекула РНК?_____
12. З яких піримідинових нуклеотидів побудована молекула РНК?_____
13. Який вуглевод входить в склад нуклеотидів з яких побудована молекула ДНК, а який в – РНК?_____
14. Правила Чаргаффа._____
15. Які є види РНК?_____

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

ТЕМА 4. ІММОБІЛІЗАЦІЯ ГЛЮКОАМІЛАЗИ І ВИВЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ІММОБІЛІЗОВАНОГО І ВІЛЬНОГО ФЕРМЕНТУ.

Лабораторне заняття № 8

Тема. Визначення активності вільного та іммобілізованого на цеоліті ферменту глюкоамілази

Мета: дослідження впливу іммобілізації ферменту на його активність.

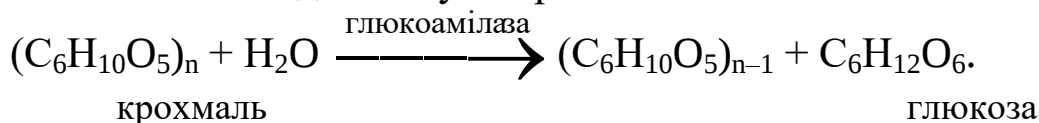
Завдання: вивчити активність вільного та іммобілізованого на цеоліті ферменту глюкоамілази.

Теоретичні основи

Глюкоамілаза Г20х – екзогенний ферментний препарат амілолітичного спектру дії. Він випускається у промислових обсягах в Україні Ладиженським заводом ферментних препаратів. Є високо очищеним препаратом, містить комплекс гідролітичних ферментів, які розщеплюють крохмаль. Це порошок світло-сірого чи світло-жовтого кольору, який добре розчинений у воді. Оптимальною для дії препарату є температура 30-40°C і рН 4,5–5,0. зберігається за температури +25°C у сухому приміщенні в герметичній тарі, оскільки він надто гігроскопічний. Промисловий препарат випускається з глюкоамілазною активністю 1000 Од./г та 2000 Од./г.

Використовується у харчовій промисловості для оцукрення крохмальвмісної сировини. У тваринництві глюкоамілаза застосовується як ферментна домішка до кормів раціону сільськогосподарських тварин, яка розщеплює крохмаль, мальтозу та інших олігоцукри до глюкози, завдяки чому підвищується рівень засвоювання кормів організмом тварин. Це сприяє підвищенню продуктивності тварин.

Хімізм реакції: Глюкоамілаза (К.Ф. 3.2.1.3. 1,4- α -D-глюкан глюкогідролаза) гідролізує α -1,4-зв'язки, послідовно відщеплюючи залишки глюкози від молекули крохмалю:



Наявність крохмалю визначають за реакцією з розчином йоду, а наявність глюкози – за реакцією Фелінга.

Матеріал й обладнання: 2%-ний свіжоприготовлений розчин крохмалю, 1,0%-ний розчин глюкоамілази (Г20х), реактив Фелінга, який готується перед заняттям змішуванням 50 мл 7,0% розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ і 50 мл 34,6% розчину сегнетової солі в 12,0% розчині NaOH , 4,0%-ний розчин йоду в йодистому калію, цеолітове борошно Сокирянського родовища, скляні пробірки на 20 мл, піпетки на 5 мл., водяна ванна, спиртовий термометр, склюграфи.

Хід роботи. У дві пробірки (контрольну та дослідну) вносять піпеткою по 3 мл розчину глюкоамілази. У дослідну пробірку додають 50 мг цеолітового борошна і струшують упродовж 5-7 хв (відбувається іммобілізація ферменту). В обидві пробірки додають піпеткою по 4 мл розчину крохмалю, змішують та поміщають у водяну ванну за температури 37°C на 20 хв.

Швидкість гідролізу крохмалю, тобто активність глюкоамілази та вплив іммобілізації на активність ферменту визначають за наявністю в іммобілізованому середовищі залишкового негідролізованого субстрату – крохмалю і продукту реакції – глюкози:

а) виявлення крохмалю: з кожної пробірки (контрольної та дослідної) після інкубації їх 20 хв. у водяній ванні за температури 37°C по 2 мл суміші переносять у дві чисті пробірки, додають до них по 3 краплі розчину йоду та змішують. Поява фіолетового забарвлення свідчить про наявність у розчині крохмалю;

б) виявлення глюкози: з контрольної та дослідної пробірок після інкубації їх у водяній ванні по 2 мл суміші переносять у дві чисті пробірки, додають до них по 2 мл реактиву Фелінга. Вміст пробірок змішують і підігрівають на полум'ї газового пальника до кипіння. Зміна синього забарвлення на червоно-цегляний свідчить про наявність у розчині глюкози.

Результати досліджень заносять в табл. 8, порівнюють забарвлення розчинів контрольної і дослідної пробірок, визначають різницю та роблять висновок про активність вільного та іммобілізованого ферментів.

Таблиця 8. Активність вільної та іммобілізованої глюкоамілази

Проби	Забарвлення з йодом (+, -)	Забарвлення з реактивом Фелінга (+, -)
Контрольна		
Дослідна		

Вивчення впливу йонів важких металів на активність іммобілізованого і вільного препарату глюкоамілази.

Активність ферментів, зокрема й глюкоамілази, залежить від дії різних факторів та їх поєднувального впливу. Вивчення можливості підтримання активності ферментів (особливо у виробничих умовах, коли в процесі живлення тварин на організм можуть впливати різні токсичні агенти) шляхом іммобілізації є одним з перспективних напрямків ведення галузі тваринництва за різних умов техногенного навантаження.

Матеріал й обладнання: 2%-ний свіжоприготовлений розчин крохмалю, 1%-ний розчин глюкоамілази (Г20х), реактив Фелінга, який готується перед заняттям змішуванням 50 мл 7% розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ і 50 мл 34,6% розчину сегнетової солі в 12% розчині NaOH , 4%-ний розчин йоду в йодистому калію, цеолітове борошно Сокирянського родовища, 1%-ний розчин сульфату Купруму, 10%-ний розчин соляної кислоти, скляні пробірки на 20 мл, піпетки на 5 мл, водяна ванна, спиртовий термометр, склографи, скляні палички.

Хід роботи. У шість пронумерованих пробірок вносять піпеткою по 3 мл 1%-го розчину глюкоамілази. У 4-ту, 5-ту та 6-ту пробірки додають по 50 мг цеолітового борошна і струшують їх упродовж 5-7 хв. У 2-гу та 5-ту пробірки додають по 1 краплі 0,1%-вого розчину сульфату Купруму та по 1-й краплі 10%-вого розчину хлоридної кислоти (HCl). В усі шість пробірок піпеткою вносять по 3 мл 2%-вого розчину крохмалю, змішують і ставлять у водяну ванну за температури 36°C на 20 хв.

Вміст пробірок ділять наполовину. До однієї половини шістьох пробірок додають по 2 краплі 0,1 М розчину йоду, а з другою половиною пробірок виконують реакцію на глюкозу з реактивом Фелінга (як і в попередньому досліді).

Порівнюють інтенсивність забарвлення з йодом і відновлення $\text{Cu}(\text{OH})_2$ в усіх пробірках. Роблять висновок про вплив іммобілізації ферменту на його стійкість до інгібуючої дії йонів важких металів та рН середовища.

Одержання безлактозного молока. У більшості ссавців активність лактази обмежена навіть у підсосний період неонатального розвитку. Максимальна активність лактази у жінок складає 10-15% активності мальтази. Недостатня активність лактази може спричинювати серйозні проблеми у дітей. При годівлі грудних дітей, надходження лактози може досягати 30-40 г/добу і перевищувати лактазну спроможність. Нерозщеплена лактоза недоступна для організму і може разом з тим підтримувати розвиток небажаної кишкової мікрофлори.

Багато людей, в основному африканського або азійського походження, володіють несприйнятністю до лактози, яка пов'язана з відсутністю лактази, що супроводжується шлунково-кишковими розладами після вживання молока. Оскільки ці люди вживають молоко в значних кількостях у дитячому віці, то можливо розвиток несприйнятності до лактози настає не зразу після народження. Несприйнятність до лактози спостерігається також у дітей з генетичним дефектом лактази. У всіх випадках обмеження лактози в харчових раціонах є зручним і високоефективним способом попередження симптомів захворювання, що зумовлене несприйнятністю до лактози.

Молекули лактози при гідролізі або під дією ферменту лактази (галактозидази) розпадаються на глюкозу і галактозу. Молоко після такої переробки одержує нові дієтичні властивості.

Перший промисловий процес одержання безлактозного молока з використанням іммобілізованого ферменту лактази був здійснений в Мілані. Одержане дієтичне молоко дещо солодше порівнянно із звичайним, оскільки глюкоза солодша ніж лактоза. Однак це не заважає його вживанню. Стабільність іммобілізованого ферменту достатньо висока, і після 50 діб роботи він зберігає 80% початкової активності. Завод в Мілані дає 10 т безлактозного молока щодоби.

Одержання цукрів з молочної сироватки. Молочна сироватка містить у своєму складі велику кількість лактози – біля 5% в рідкій і 75% у висушеній сироватці. Ферментний гідроліз лактози в сироватці відкриває нові можливості одержання цукристих речовин із нетрадиційної сировини, вносить також певний вклад у вирішення проблем харчування і екології, оскільки сироватка утилізується не повністю.

Перший промисловий процес гідролізу лактози в молочній сироватці за допомогою іммобілізованого ферменту лактази був реалізований в 1980 р. спільно англійською, французькою і американськими компаніями одночасно в Англії і Франції.

Перед введенням у реактор з іммобілізованим ферментом сироватку пастеризують, піддають ультрафільтрації і пропускають через йонообмінник, з метою її демінералізації. Потужність установки складає біля 1000 л за ступенем конверсії лактози 80%. Установка повністю автоматизована. Одержані при цьому цукри (глюкоза і галактоза) по солодкості в півтора рази перевищують солодкість харчового цукру в розрахунку на однакові економічні затрати.

За даними Італійської компанії “Снам Проджетті”, тривалість роботи іммобілізованого фермента в реакторі з молочною сироваткою суттєво

залежить від якості сироватки і часу інактивації фермента, який змінюється від 60 (при обробці депротейнізованої і демінералізованої сироватки) до 8 діб (для необробленої кислої сироватки). У зв'язку з цим у промислових умовах щоденно по півгодини проводять очистку колон з іммобілізованою лактазою розведеною оцтовою кислотою. Час роботи системи в лабораторних умовах складає біля двох років.

Висновки:

Контрольні питання.

1. Що розуміють під терміном іммобілізація та іммобілізовані ферменти?

2. Які переваги мають іммобілізовані ферменти порівняно з нативними ферментами?_____

3. Які носії використовують для іммобілізації і як вони класифікуються?

4. Назвіть неорганічні носії, які використовують для одержання іммобілізованих ферментів і їх недоліки._____

5. Назвіть природні органічні полімерні носії як матриці для іммобілізації. _____

6. Перерахуйте синтетичні полімерні носії як матриці для іммобілізації.

7. Перерахуйте природні поліцукристі носії як матриці для іммобілізації.

8. Якими методами можна провести іммобілізацію ферментів?_____

9. На чому базується адсорбційна іммобілізація?_____

10. Як відбувається іммобілізація ферментів при їх включенні у ліпосоми?_____

11. В чому суть методу хімічної іммобілізації ферментів?_____

12. В чому суть методу фізичної іммобілізації ферментів?_____

13. Поясніть явище іммобілізації клітин і його значення?_____

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

ТЕМА 5. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ГІАЛУРОНІДАЗИ (ЛІДАЗИ).

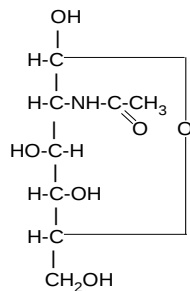
Лабораторна робота № 9 Тема. Виділення лідази

Мета: вивчити біотехнологічний процес одержання лідази.

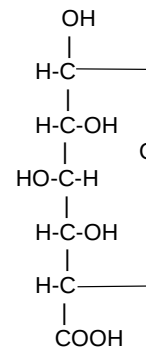
Завдання: одержання лідази із сім'яників сільськогосподарських тварин (биків або баранів).

Теоретичні основи

Лідаза (КФ 4.2.2.1 гіалуронат-ліаза, гіалуронідаза,) – фермент, який каталізує поступове розщеплення β -(1 $\rightarrow$ 4)-зв'язків гіалуронової кислоти з утворенням ацетилглюкозаміну та глюкуронової кислоти:

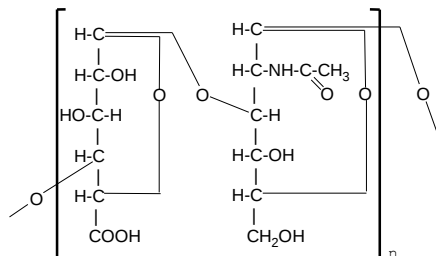


Н-ацетилглюкозамін



Глюкуронова кислота

Гіалуронова кислота – мукополісахарид, який складається майже з однакових кількостей глюкозаміну (35-43%) і глюкуронової кислоти (40-43%). Його структурною одиницею є дисахарид, що складається з залишків D-глюкуронової кислоти і N-ацетил-D-глюкозаміну, з'єднаних β -(1 $\rightarrow$ 3)-зв'язком:



Дисахаридні одиниці сполучені β -(1 $\rightarrow$ 4)-зв'язком. Отже в гіалуронової кислоті чергуються зв'язки типу β -(1 $\rightarrow$ 3) і β -(1 $\rightarrow$ 4). Гіалуронова кислота є лінійним полімером, її карбоксильні групи повністю йонізовані і за рН 7,0 несуть негативний заряд. Наявність великої кількості груп з однаковими зарядами перешкоджає утворенню щільної структури. Внаслідок цього молекула гіалуронової кислоти має

велику поверхню, на якій розміщено багато активних груп, що зумовлює різноманітність фізико-хімічних процесів. Гіалуронова кислота зв'язує велику кількість води, утворюючи в'язку, клейкувату сполуку. Саме через це вона сприяє затриманню води і різних йонів (катіонів) в організмі тварин, а також, певною мірою, зумовлює стан процесів проникності. Висока гідрофільність гіалуронової кислоти є однією з важливих причин нормального тургору клітин.

Вважають, що основною функцією гіалуронової кислоти є зв'язування води в інтерстиціальних просторах та утримування клітин разом в желеподібному матриксі. Звичайно гіалуронова кислота буває зв'язаною з білками. Вона входить до складу сполучної тканини як основна цементуюча речовина, що склеює окремі клітини і міжклітинні елементи. Бар'єрні функції основної міжклітинної речовини в значній мірі визначаються вмістом в ній гіалуронової кислоти. Внаслідок високої в'язкості вона знижує проникність оболонок клітин і цим запобігає проникненню у тканини мікроорганізмів і багатьох сполук, які шкідливо впливають на організм тварин. У значних кількостях гіалуронова кислота знаходиться в скловидному тілі ока, синовіальній рідині, капсулах багатьох бактерій.

Гіалуронатліаза є в бактеріях, які мають високу вірулентність, швидкоростучих злоякісних клітинах, бджолиній і зміїній отрутах. Фермент виявлений також і в тканинах тварин, де він виконує специфічні функції. Зокрема, запліднення яйцеклітини у ссавців спряжено з розщепленням гіалуронової кислоти гіалуронатліазою. Саме цим пояснюється високий вміст фермента в сім'яниках тварин.

Хід роботи. Лідазу одержують з сім'яників биків або баранів. На першій стадії сім'яники заморожують і в такому стані витримують один місяць. Після цього тканини сім'яників подрібнюють і проводять екстракцію білків 0,1 N розчином ацетатної кислоти за температури +5-10°C 10 годин. Далі на центрифугу відділяють залишки тканин, а білки рідкої фази осаджують ацетоном у такому співвідношенні 4 об'єми ацетону : 1 об'єм надосадової рідини. Коагуляцію білків проводять на холоді (0-3°C) 4 години. Після відстоювання верхній прозорий рідкий шар відсмоктують або видаляють декантуванням. До осаду, що залишився, додають дистильовану воду, обережно перемішують і залишають на деякий час. При цьому лідаза розчиняється, а нерозчинні білки залишаються в осаді. Рідку фазу відділяють від твердої центрифугуванням. Надосадову рідину знову осаджують ацетоном у співвідношенні 1:6. Після відстоювання суміші рідкий ацетоновий шар відділяють, а нижній переносять на спеціальний фільтр (грибок-фільтр).

На фільтрі залишається порошок рожевого кольору. Його розчиняють у дистильованій воді і очищають від мікроорганізмів методом стерильної фільтрації. Далі визначають активність лідази, розфасовують у стерильні ампули і, оскільки лідаза в розчині нестабільна, її концентрують методом сублімаційної сушки у вакуумі за температури 40-50°C. Суть сублімаційної сушки така: розчин лідази в ампулах заморожують, а потім різко нагрівають у вакуумі. При цьому заморожений осад, минаючи рідку фазу, перетворюється в порошок. Зберігають одержаний препарат за низьких температур.

Лідаза широко застосовується в медичній і ветеринарній практиці. Вона сприяє розсмоктуванню рубців у післяопераційний період, посилює проникнення в тканини різних лікарських препаратів (за одночасного її введенні з ними), є ефективною при лікуванні захворювань суглобів.

Висновки:

Контрольні питання.

1. Що таке транскрипція? _____
2. Де в клітині проходить транскрипція? _____
3. Які є етапи транскрипції? _____
4. Що таке трансляція? _____
5. Де в клітині проходить трансляція? _____
6. Які є етапи трансляції? _____
7. Що таке локус? _____
8. Що таке ген? _____
9. Що таке оперон? _____
10. Що таке оператор? _____
11. Що таке репресор? _____

12. Що таке промотор?_____
13. Що таке термінатор?_____
14. Що таке регуляторні гени?_____
15. Що таке структурні гени?_____
16. Що таке екзони?_____
17. Що таке інтрони?_____
18. Що таке сплайсинг?_____
19. Які відмінності в будові генів прокаріот та еукаріот?_____
20. Що таке праймер?_____
21. Що таке плазміда?_____
22. Що таке вектор?_____
23. Що таке епісома?_____
24. Що таке бактеріофаг?_____
25. Що таке трансдукція?_____
26. Яка суть отримання генів методом хімічного синтезу?_____
27. Які є недоліки методу хімічного синтезу генів?_____
28. Відкриття якого ферменту дозволило розробити метод виділення генів з природного матеріалу?_____
29. Які ферменти каталізують реакцію при якій з'єднуються кінці векторної ДНК та кінці гена?_____
30. Для чого використовують ДНК-лігази при отриманні рекомбінантних ДНК?_____

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

ТЕМА 6. БІОКОНВЕРСІЯ ВІДХОДІВ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО ВИРОБНИЦТВА ТА БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ БІОГАЗУ.

Лабораторне заняття № 10

*Тема. Розрахунки основних параметрів біотехнологічного процесу
переробки гнойової маси в біогаз*

Мета: ознайомитись з методикою розрахунків виходу біогазу в процесі утилізації відходів сільськогосподарського виробництва.

Завдання: оволодіти методами математичного розрахунку процесів біоконверсії відходів сільськогосподарського виробництва в біогаз.

Теоретичні основи

Біогаз – це продукт обміну речовин в організмах багатьох груп бактерій. Відомо, що в метаногенезі, окрім метанових бактерій, беруть участь інші групи мікроорганізмів, а саме:

- бактерії, що перетворюють продукти деструкції целюлози в янтарну (сукцинат), пропіонову (пропіонат), масляну (бутират), молочну (лактат), ацетатну (ацетат) кислоти, спирти, CO_2 та H_2 ;

- ацетогенні бактерії, які зброджують утворені первинні метаболіти, синтезуючи ацетат, форміат (мурашина кислота), CO_2 та H_2 .

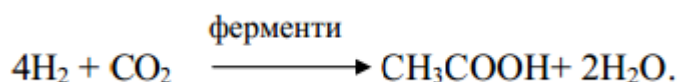
Утворені сполуки можуть входити в поживні субстрати для метаногенів. Умовно виділяють чотири стадії бактеріального метаболічного руйнування органічних субстратів з отриманням біогазу.

I стадія – бактерії-аероби за допомогою ферментів перетворюють високомолекулярні сполуки, що містяться в біомасі відходів (білки, поліцукриди, в основному целюлозу й ліпіди) у низькомолекулярні водорозчинні зброджувані метаболіти: цукри, амінокислоти, жирні кислоти. Процес гідролізу полімерних молекул органічного субстрату під дією екзоферментів бактерій (амілаз, протеаз, ліпаз) проходить повільно, що зумовлено рівнем рН середовища (оптимальний $\text{pH} = 4,5\text{--}6,0$) й тривалістю перебування перших у ферментаторі.

II стадія – до розщеплення залучаються кислотоутворювальні бактерії, в середину клітин яких проникають окремі молекули, де вони продовжують ферментативно змінюватись. З них в анаеробних умовах, коли $\text{pH} = 6,0\text{--}7,5$, утворюються, у першу чергу, нестійкі карбонові кислоти: ацетатна, мурашина, молочна, янтарна, масляна, пропіонова, низькомолекулярні спирти (етанол) і гази – Карбон (IV) оксид, водень, сірководень та амоніак. При цьому формуються необхідні умови для

активації метанових бактерій (рівень рН знижується). Цей етап називають фазою біологічного окиснення.

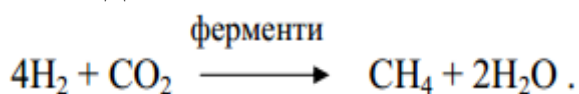
III стадія – проходить перетворення органічних кислот (бурштинової, мурашиної, масляної, молочної, пропіонової) на продукти, що є попередниками метану, а саме: ацетатну кислоту, Карбон (IV) оксид й водень. У цьому процесі беруть участь кислотоутворювальні (ацетогенні) групи бактерій, до яких належать *Clostridium aceticum*, *Clostridium thermoaceticum*, *Acetobacterium woodii*. Отже, в середовищі, де утворюється метан, обов'язкова наявність ацетатної кислоти відповідно до такого рівняння:



В організмі метанових бактерій, подібно до ацетогенів, синтез у клітинних структурах ацетату з CO_2 і H_2 відбувається через етап утворення метаболітів ацетил-КоА та пірувату.

IV стадія (останній етап) – продукти життєдіяльності метанових бактерій (*Methanobacterium formicicum*, *Methanospirillum hungati*) ацетат, діоксид Карбону й водень переважно перетворюються в метан (до того ж, саме на цьому етапі синтезується 90% усього метану). Слід підкреслити, що III стадія біосинтезу ацетатної кислоти відіграє найбільш відповідальну роль у швидкості процесу метаноутворення. Оптимальне значення показника рН при цьому підтримується на рівні 7 (його коливання можуть перебувати в діапазоні 6,6–8,0).

Основним джерелом енергії для метанових бактерій є саме молекула H_2 (донор водню) й діоксид вуглецю, який бере участь у біосинтезі клітинних речовин названих видів бактерій. Утворення метану відбувається за спрощеною відновною біокаталітичною реакцією, а саме:



Ланцюговий механізм анаеробного процесу метаногенезу з використанням органічної сировини показано на схемі (рис. 1). Біохімічне перетворення водню й карбон (IV) оксиду на метан – складний багатоступеневий процес за участю багатьох структурних компонентів метанових бактерій, серед яких спеціалізовані ферменти, коферменти (небілкова частина ферменту). Основним чинником розщеплення органічного матеріалу на окремі складові компоненти й перетворення їх у метан (унаслідок метанового бродіння твердих субстратів) є водне середовище, оскільки більшість бактерій здатні споживати речовини тільки в розчиненій формі.

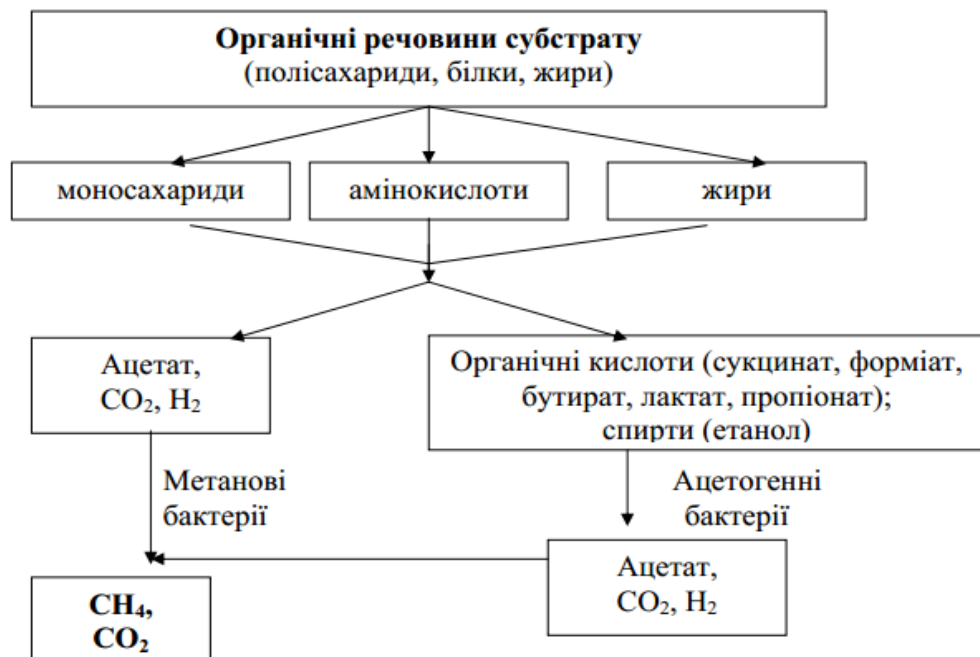


Рис. 1. Схема поетапного ланцюгового процесу утворення біогазу з органічної маси (за даними Т.П. Пирог, 2004)

Якість біогазу залежить від вмісту в ньому метану або від співвідношення між першим (CH₄) і карбон (IV) оксидом (CO₂), який розчиняється в біогазі спричиняє його втрати під час зберігання. Забезпечення високої концентрації метану в біогазовій суміші відбувається завдяки таким критеріям:

- вибір оптимальної схеми проведення процесу одноступеневої або двоступеневої ферментації (у двоступеневих установках біогаз містить до 80% метану);

- дотримання кількісного та якісного складу поживних речовин субстрату (висока концентрація вуглеводів, протеїнів і ліпідів дає більш високий вихід метану; наприклад, виділений із субстратів, багатих на кукурудзу, біогаз містить в середньому 53% метану);

- підтримання температурного режиму в субстраті (якщо, наприклад, температура занадто висока, то у ферментаторі вихід метану нижчий через різну розчинність компонентів та кількість утворення CO₂; причому чим більша кількість CO₂ переходить у газоподібну форму, тим меншим буде вміст CH₄ в біогазі);

- обмеження кількості сірководню (H₂S) як дуже агресивного компоненту, що викликає корозію арматури, газових лічильників, пальників і двигунів, а відтак може виникнути потреба в очищенні біогазу від Сульфур.

Кількість амоніаку, елементарного азоту, водню й кисню в біогазовій суміші може становити 6–8%. Належить враховувати також, що газ, який надходить із біогазової установки, насичений водяною парою. Його сушіння способом конденсації сприяє збагаченню цього продукту. До цього ж за допомогою конденсату вдається сепарувати велику кількість амоніаку, що міститься в біогазі й може викликати значні пошкодження двигунів та підшипників з кольорових металів.

Конструктивно-технологічні параметри й технологічні схеми біогазових установок підбирають з огляду на об'єми переробки та властивості зброджуваного матеріалу, враховуючи тепловий режим, способи завантаження субстрату, інокуляту й ряд інших факторів. Основними елементами обладнання для проведення метаногенезу є метантенк, або герметично закритий резервуар, з теплообмінником (теплоносієм у ньому виступає вода, підігріта до 50–60°C), пристрої для введення поживних речовин і бактерій, а також відведення утвореного газоподібного продукту.

У деяких країнах метантенки конструктивно – це водонепроникні циліндричні цистерни, які називають дайджестерами (у них температура зброджування становить 30–37°C, рН субстрату 7,0). Переробка органічного матеріалу триває 2–4 тижні. Над дайджестером встановлюють газгольдер, тобто сталевий циліндричний контейнер (або нейлоновий купол), його призначено для збору біогазу.

У приватних господарствах, на дачах можна будувати спеціальні дайджестери з цегли, цементу, глини й обкладати їх товстим шаром ґрунту, що сприяє кращому їх нагріванню та ізоляції від нічного охолодження. Функціональну схему отримання біогазу з органічних відходів сільського господарства подано на рис. 2. Для інтенсифікації метаногенезу органічний субстрат у таких установках додатково засівають ацетогенними й метаногенними бактеріями, серед яких розрізняють мезофіли (витримують температуру 30–40°C); термофіли, адаптовані до середовищ з температурою 50–60°C; психрофіли – до 20°C. Оптимальне масове співвідношення елементів C:N у субстраті для метаногенезу, перебуває в діапазоні 11–16:1. Причому підвищення вмісту азоту призводить до виділення амоніаку в середовище. Щоб цього уникнути, у відходи, які містять багато азоту, додають рослинні матеріали вуглеводного складу (подрібнену соломку, жом цукрової тростини, відходи цукрового буряку та ін.).

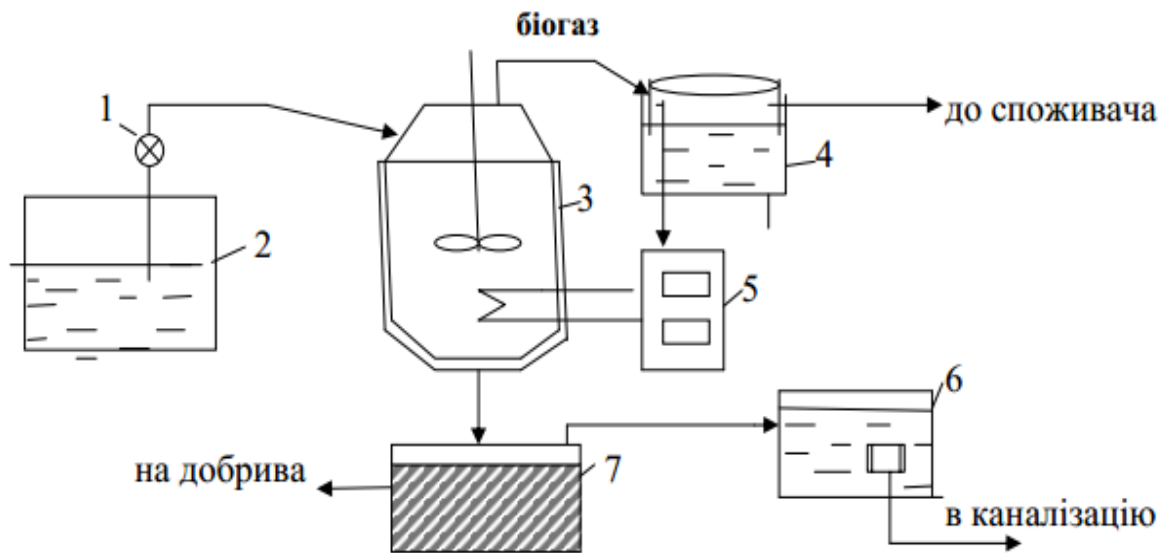


Рис. 2. Принципова схема біогазової установки для конверсії рідкого гною: 1 – насос; 2 – гноєприймач; 3 – біореактор-метантенк; 4 – газгольдер; 5 – котел для підігрівання води; 6 – аеротенк; 7 – гноєсховище

Взагалі, найчастіше біореактор виготовляють із залізобетону, що економить витрату металу. Об'єм апарата залежить від кількості гною, який буде перероблятися, що у свою чергу, зумовлено чисельністю й масою тварин, а також способом видалення відходів (наприклад, у разі змивання безпідстилкового гною загальна кількість стоків небажано збільшується, що призводить до підвищення енерговитрат на їхнє підігрівання). Мінімальний термін витримки гною становить 12 діб. Отже, коли відома добова кількість стоків на підприємстві, то можна розрахувати необхідний об'єм біореактора, збільшивши отриману величину на 10% (оскільки реактор необхідно заповнювати субстратом на 90%). Для безперервної роботи біореактора в нього постійно завантажуються нові порції субстрату, при цьому відбирають відповідну кількість ферментованого продукту.

Обладнання й матеріали: таблиці з фізіологічними показниками тварин та нормативними даними, формули розрахунків.

Хід роботи. 1. Визначення кількості гнойової біомаси у господарстві, яка підлягає утилізації з одержанням біогазу. Одним із важливих факторів, що впливають на об'єм біогазу, є вид біомаси, яка використовується. Це пояснюється значними відмінностями в хімічному складі гнойової біомаси різних видів сільськогосподарських тварин.

1.1. Розрахунок добового та річного виходу гнойової біомаси. Вихід гнойової біомаси залежить від багатьох факторів: корму, виду та віку

тварин, типу годівлі, способу утримання, технології видалення та нагромадження гнойової біомаси. Добовий вихід гною в процесі утримання тварин без підстилки визначається як сума екскрементів і кількості води, яка надходить із усіх джерел у систему гноєвидалення; у випадку утримання тварин із використанням підстилки, враховується її кількість.

Таблиця 9. Добовий вихід калових мас та сечі (МЕJ) від тварин, кг

Вид та вікові групи тварин	Вихід на 1 голову		
	кал	сеча	всього
ВРХ: корови	35	20	55
нетелі	20	7	27
телята віком 0-6 міс.	5,0	2,5	5,0
молодняк на відгодівлі:			
6 міс.	10	5	15
9 міс.	10	9	19
12 міс.	14	12	26
Свині: свиноматки	3,1	3,0	6,1
Поросята: 0-2 міс.	0,8	2,5	3,3
2-4 міс.	1,4	2,2	3,6
Підсвинки до 6 міс.	1,6	2,6	4,2
Свині на відгодівлі	1,5	3,5	5,0
Кури			0,27-0,32
Індики			0,45-0,40
Качки			0,40-0,50
Гуси			0,60-0,70

1.1.1. Добовий вихід безпідстилкового гною. Визначається за формулою: $Q \text{ г.доб.} = (MEJ + BJ) \times n_j : 1000$ (1), де $Q \text{ г.доб.}$ – добовий вихід гною, т; MEJ – добова маса екскрементів від однієї голови, кг (табл. 9); BJ – добова кількість води, яка надходить у систему гноєвидалення, кг; n_j – поголів'я тварин чи птиці виробничої групи, які одночасно утримуються на фермі або комплексі, гол. Добова кількість води (BJ), яка потрапляє в систему гноєвидалення, розраховується за формулою: $BJ = K \times MEJ$ (2), де MEJ – добова маса екскрементів від однієї голови, кг (табл. 9); K – коефіцієнт (табл. 10).

1.1.2. Добовий вихід гнойової біомаси з використанням підстилки визначається за формулою: $Q \text{ г.доб.} = (MEJ + BJ + Mpn_j) \times n_j : 1000$ (3), де $Q \text{ г.доб.}$ – добовий вихід гною, т; MEJ – добова маса екскрементів від однієї голови, кг (табл.9); BJ – добова кількість води, яка надходить у

систему гноєвидалення; nJ – поголів'я тварин чи птиці виробничої групи, які одночасно утримуються на фермі чи комплексі, гол.; Mn_j - добова кількість підстилки на 1 гол., кг. Добова кількість води, яка надходить у систему гноєвидалення, розраховується за формулою 2.

Таблиця 10. Добова кількість води, яка потрапляє в систему гноєвидалення

№ п/п	Система видалення	Коефіцієнт, який розраховується від добового виходу екскрементів тварин
1	Транспортерна (конвейєрна)	(0, 1-0,2) ME _j
2	Самосплавна	(0,3-0,5) ME _j
3	Лотково-змивна із сухою чисткою підлоги	(2,0-2,5) ME _j
4	Лотково-змивна з вологою чисткою підлоги	(5,0-6,0) ME _j
5	Гідрозмив	(7,0-8,0) ME _j

1.1.3. Річний вихід гнойової маси. Річний вихід гною залежить значною мірою від способу утримання. В процесі цілорічного утримання тварин з використанням підстилки або без неї цей показник розраховується за такою формулою: $Q \text{ г.річний.} = Q \text{ г.доб.} \times t$ (4), де t – кількість діб у році (365).

- за умов стійлово-табірного утримання тварин з використанням підстилки в приміщеннях (245 діб) і без підстилки в таборах (120 діб) добовий та річний вихід гнойової маси розраховується за формулою:

$Q \text{ г.річний.} = [(ME_j + Mn_j + V_j) \times tn + (Mn_j + V_j) \times tl] \times nj : 1000$, т., де:

$Q \text{ г.доб.} = Q \text{ г.річний.} : t$ (5), де t – обліковий час, діб (час утримання тварин в приміщеннях - tn ; у літніх таборах - tl , t – 365 діб);

- за умов стійлово-пасовищного утримання з використанням вигульно-кормових майданчиків, річне нагромадження гною скорочується на 30% і розраховується за формулою:

$Q \text{ г.річний.} = [(ME_j + Mn_j + V_j) \times tn + (Mn_j + V_j) \times 0,3 \times tl] \times nj : 1000$,
 $Q \text{ г.доб.} = Q \text{ г.річний.} : t$ (6)

Примітка: стійлове утримання – 245 днів, пасовищне – 120 діб.

2. Визначення якісних параметрів гнойової біомаси.

На вихід біогазу суттєво впливає хімічний склад гнойової біомаси. У дослідях визначена залежність між об'ємом одержаного біогазу і вмістом сухої речовини в біомасі. Для гною великої рогатої худоби ця залежність є прямою; для курячого посліду – зворотною, що пояснюється інгібуючою дією високих концентрацій амоніаку на метаносинтезуючі мікроорганізми.

Оптимальними для вихідної гнойової біомаси є такі фізико-хімічні параметри: концентрація сухої речовини – 8-12 % (не більше 12 %), вміст органічної речовини – не менше 80 %, співвідношення C:N – 10-30:1; pH - 6,8-7,5. Для визначення вмісту сухої речовини у гнойовій біомасі необхідні дані щодо вологості гною, який виходить із ферми, а вона значною мірою залежить від способу утримання тварин та системи гноєвидалення.

2.1. Вологість гнойової біомаси, яка виходить із ферми.

2.1.1. Вологість безпідстилкового гною. В процесі безпідстилкового утримання тварин одержують рідкий гній, до складу якого входять екскременти тварин, певна кількість кормів, а також вода, яка потрапляє в систему гноєвидалення при митті обладнання, за рахунок витікання із автонапувалок і водопровідної мережі тощо. Вологість безпідстилкового гною визначається за формулою: $W_r = (W_E + 100 Z) : (1 + Z)$ (7), де W_r – відносна вологість гною, %; W_E – відносна вологість екскрементів, % (табл. 11); Z – показник, який враховує кількість води, яка потрапляє в систему гноєвидалення (табл. 12).

Таблиця 11. Відносна вологість екскрементів тварин, %

Види тварин	Вологість, %		
	кал	сеча	суміш
ВРХ	83-84	94-95	86-87
Свині	76-78	94-95	87-88
Вівці	69-76	94-95	77-79
Коні	71-72	95 96	77-79
Кури	-	-	73-76
Індики	-	-	73-76
Качки, гуси	-	-	83-85

2.1.2. Вологість підстилкового гною. Вологість підстилкового гною визначається за формулою:

$$W_r = W_E - 0,01 \times P_n \times (W_E - W_n) + 0,01 \times P_v \times (100 - W_E) \quad (8), \text{ де}$$

W_r – відносна вологість гною, %; W_E – вологість екскрементів (табл. 10); W_n – вологість підстилки (соломи) – 19,6 %; P_n , P_v – співвідношення

у гнойовій масі підстилки і води, %. P_n та P_v розраховуються за формулами:

Таблиця 12. Показник, який враховує кількість води, що потрапляє в систему гноєвидалення

№ п/п	Спосіб видалення гною	Z
1	Транспортерний	0,2-0,3
2	Самосплавний	0,4-0,5
3	Лотково-змивний з сухою чисткою підлоги	2,0-2,5
4	Лотково-змивний з вологою чисткою підлоги	5,0-6,0
5	Гідрозмив	7,0-8,0

$$P_v = (V_j \times 1000) : (ME_j + V_j + M_{nj}), \% \quad (9)$$

$P_n = (M_{nj} \times 100) : (ME_j + V_j + M_{nj}), \%$ (10), де P_n – співвідношення в гнойовій біомасі води, %; P_v – співвідношення в гнойовій біомасі підстилки, %; ME_j – добова маса екскрементів від однієї голови, кг (табл. 8); M_{nj} – добова кількість підстилки на 1 гол., кг (табл. 12); V_j – добова кількість води, яка потрапляє в систему гноєвидалення, кг (формула 2).

2.1.3. Вологість гною за стійлово-табірного утримання. За цієї системи тварини можуть утримуватися 245 діб у приміщеннях із використанням підстилки і 120 діб – у таборах без використання підстилки. Вологість гною у цьому випадку розраховують за формулою: $W_r = [(W_1 \times 2) + W_2] : 3$ (11), де W_r – відносна вологість гною, який надходить з ферми, %; W_1 – відносна вологість гною в процесі підстилкового утримання, %; W_2 – відносна вологість гною за безпідстилкового утримання, %

Таблиця 13. Норми витрат підстилкового матеріалу (соломи), кг на одну голову на добу.

Вид і вік тварин	Спосіб утримання			
	У групових клітках	Прив'язний	Боксовий	Безприв'язний на глибокій підстилці
1. ВРХ				
- корови;	-	1,5	0,5	3,0
- відгодівля;	-	1,0	-	3,0
- молодняк.	1,0	1,5	0,5	1,5
2. Свині	0,5	-	-	-

2.1.4. Вологість гною, який надходить із ферми від різних виробничих груп. Визначається за формулою: $W_c = (W_1 + W_2 + \dots + W_n) : n$

2.2 Вміст сухої речовини у гнойовій біомасі. Визначається розрахунковим методом за формулою: $P_{a.c.p.} = [Q_r \times (100 - W)] : 100$, де $P_{a.c.p.}$ – вміст абсолютно сухої речовини у гнойовій біомасі, т; Q_r – вихід гною із ферми (добовий або річний), т; W – відносна вологість гною, %.

2.3 Вміст органічної речовини в гнойовій біомасі. Дослідженнями доведено, що у гнойовій мвсі різних видів сільськогосподарських тварин міститься в середньому до 80% органічної речовини і близько 20 % – неорганічної. Хімічний склад гною наведений у табл. 14.

Таблиця 14. Хімічний склад гною сільськогосподарських тварин, % у сухій речовині (за В. Баодеру, 1982).

Компоненти	Види тварин			
	ВРХ		Свині	Кури
	корови	відгодівля		
Органічна речовина	77-84	77-85	77-84	76-77
Сира клітковина	27,6-50,3	-	19,5-21,4	13,0-17,8
Сирий жир	2,9-4,3	-	3,5-4,0	2,4-5,0
Сирий протеїн	9,3-20,7	-	16,4-21,5	20,5-42,1
Лігнін	16-30	16-30	-	9,6-14,3
Азот	1,9-6,5	2,3-4,0	4,0-10,3	2,3-5,7
Фосфор	0,2-0,7	0,4-1,1	1,9-2,5	1,0-2,7
Калій	2,4	1,0-2,0	1,4-3,1	1,0 -2,9
Кальцій	2,3-4,9	0,6-1,4	-	5,6 -11,6
Магній	-	0,5-0,6	-	0,9-1,1

Кількість органічної речовини у гнойовій біомасі, яку одержують від тварин за добу та за рік, визначається за формулою: $O_p = P_{a.c.p.} \times 0,8$, т, (14), де O_p – кількість органічної речовини в гної, т; $P_{a.c.p.}$ – вміст абсолютно сухої речовини, т.

3. Визначення основних параметрів системи анаеробного зброджування гнойової біомаси (метантенка БГУ). Найбільш значимими параметрами анаеробного зброджування гнойової біомаси є добова продуктивність реактора або його пропускна здатність за кількістю гною, який виходить із ферми, добовий обсяг завантаження бродильної камери, об'єм реактора БГУ, добовий та річний вихід біогазу, залежно від хімічного складу гнойової біомаси тощо.

3.1 Добова продуктивність реактора, або його пропускна здатність щодо вихідного гною. Визначається за кількістю вихідної гнойової

біомаси за формулою: $G_{\text{доб.}} = Q_r \text{ річн.} : (t_{\text{річн.}} - t_z)$, т/добу (15), де $G_{\text{доб.}}$ – добова продуктивність реактора щодо вихідного гною, т/добу; $Q_r \text{ річн.}$ – річна кількість гнойової біомаси на фермі, т; $t_{\text{річн.}}$ – кількість діб у році (365); t_z – тривалість запуску і обслуговування реактора, діб (у середньому 30 діб).

3.2. Добовий обсяг завантаження метанотанка, м^3 . Добовий обсяг завантаження метанотанка дорівнює добовому виходу з ферми рідкого гною вологістю 88-92%, т. $Q_{\text{доб.}}$ розраховується за формулою: $Q_{\text{доб.}} = (W_{r2} \times Q_{g.\text{доб.}}) : W_{r1}$, т, де: W_{r1} – відносна вологість гною, який виходить з ферми, %; W_{r2} – відносна оптимальна вологість гною (88-92%); $Q_{\text{доб.}}$ – добовий вихід гною на фермі, т.

Для переведення маси гною з т в м^3 користуються питомою вагою рідкого гною. Залежно від вологості, 1 м^3 гною відповідає:

1080	кг гною за вологості	88%;
1070	-/- -/- -/- -/- -/-	89%;
1060	-/- -/- -/- -/- -/-	90%;
1050	-/- -/- -/- -/- -/-	91%;
1040	-/- -/- -/- -/- -/-	92%.

3.3 Місткість (об'єм) бродильної камери. Рентабельність біогазового виробництва значною мірою залежить від об'єму бродильної камери. В процесі її проектування перш за все враховується кількість гнойової біомаси, яка підлягає утилізації. Об'єм бродильної камери визначається за формулою:

$V_k = (Q_{\text{доб.}} \times 100) : p q$, (17), де: V_k – місткість бродильної камери, м^3 ; $Q_{\text{доб.}}$ – добовий обсяг завантаження метанотанка, м^3 ; p – добова доза завантаження, % (для мезофільного процесу – 7%, для термофільного процесу – 15%); q – коефіцієнт заповнення камери (в межах 0,8-0,95).

3.4. Обсяг газогенерації, або добовий та річний вихід біогазу. Максимальний вихід біогазу на стадії найбільш інтенсивного метаногенезу залежить від хімічного складу біомаси, який визначається видом тварин і відповідно, раціоном, який вони одержують. Так, з 1 кг сухої речовини гнойової біомаси, внесеної в реактор біогазової установки, теоретично можна одержати в середньому 0,4-0,6 м^3 біогазу. Враховуючи те, що тільки 40-50% сухої речовини гною у процесі метаногенезу трансформується в біогаз, реальний вихід біогазу із 1 кг сухої речовини гною великої рогатої худоби складає в середньому 0,2-0,5 м^3 , а із еквівалентної маси свинячого гною – 0,3-0,7 м^3 біогазу (реактор працює, на мезофільному режимі). Із біомаси курячого посліду біогазу виходить більше, ніж із гною великої рогатої худоби або свиней. Крім кількості сухої речовини, дуже суттєвим параметром, який впливає на

вихід біогазу, є вміст і склад органічної речовини гнойової біомаси. Дані про хімічний склад гною подані у табл. 9.

Добовий вихід біогазу розраховується за формулами з врахуванням вмісту в гнойовій біомасі або тільки сухої речовини (ф.18) чи сухої та органічної речовин (ф.19): $V_{\Gamma} = [Q_{\Gamma} \times (100 - W) : 100 \times Z] : 100 \times K \times V, \text{ м}^3$, де: V_{Γ} – добовий або річний вихід біогазу, м^3 ; Q_{Γ} – добовий або річний вихід гною з ферми, т (кг); W – відносна вологість гною, %; Z – стан розкладання органічної речовини, % (30); K – коефіцієнт розчинності біогазу (1,1-1,5); V – питома вага біогазу (при вмісті за об'ємом: метану 65% та оксиду карбону (IV) 35% - дорівнює 0,00117 т/м³ або 1,17 кг/м³).

$V_{\Gamma} = [Q_{\Gamma} \times (100 - W) : 100] \times (L : 100) \times K \times \rho, \text{ м}^3$, де: V_{Γ} – добовий або річний вихід біогазу, м^3 ; Q_{Γ} – добовий або річний вихід гною, кг; W – відносна вологість гною, %; K – коефіцієнт зброджування органічної речовини (0,3); ρ – вихід біогазу при зброджуванні 1 кг органічної речовини (0,7); L – вміст органічної речовини, % (80).

4. Визначення виходу залишкової продукції. Після зброджування гнойової біомаси та одержання біогазу, виходять тверда фракція гною (шлам) і надосадова рідина (рідка фракція). Кількість твердої і рідкої фракції залежить як від вологості гною, який завантажується, так і вологості фракцій, які одержуємо (твердої і рідкої).

4.1. Вихід твердої фракції (шламу). Визначається за формулою:

$M_{\text{ш.річн.}} = Q_{\Gamma} \text{ річн.} \times (W_{\Gamma} - W_{\text{ш}}) : (W_{\text{q}} - W_{\text{ш}}) \text{ (20)}$, де: $M_{\text{ш.річн.}}$ – річна маса шламу, т; $Q_{\Gamma} \text{ річн.}$ – річний вихід гною, т; W_{q} – вологість рідкої фракції, % (98-99); W_{Γ} – вологість гною, що завантажується, % (88-92); $W_{\text{ш}}$ – вологість шламу, % (87).

4.2. Вихід рідкої фракції. Визначається за формулою: $M_{\text{q.річн.}} = Q_{\Gamma} \text{ річн.} \times (W_{\Gamma} - W_{\text{ш}}) : (W_{\text{q}} - W_{\text{ш}}) \text{ (21)}$, де: $M_{\text{q.річн.}}$ – річна маса рідкої фракції, т

Відповідно, добовий вихід рідкої і твердої фракцій визначається: $M_{\text{ш.доб.}} = M_{\text{ш.річн.}} : 365 \text{ (22)}$, $M_{\text{q.доб.}} = M_{\text{q.річн.}} : 365 \text{ (23)}$.

5. Визначення виходу товарного біогазу. Частина біогазу, яку отримують у процесі анаеробного бродіння, використовується для підігрівання біомаси, яка зброджується. Крім того вихід товарного біогазу значною мірою залежить від втрат теплової енергії за анаеробного бродіння.

5.1 Визначення теплової енергії, необхідної для підігрівання біомаси

Визначається за формулою: $\epsilon_{\text{бгу}} = C \times Q_{\Gamma} \text{ річн.} \times \Delta t \text{ (24)}$, де: $\epsilon_{\text{бгу}}$ – теплова енергія, необхідна для підігріву гною до температури бродіння, МДж; $Q_{\Gamma} \text{ річн.}$ – річна кількість гною, яка виходить з ферми; кг; Δt –

різниця температури зброджування і температури вихідного гною ($t_{\text{бр}} - t_{\text{гною}}$), °C; C – питома теплоємність рідкого гною (4,19 КДж/кг·град).

Примітка: $t_{\text{бр}}$ залежить від режиму роботи БГУ, а t° вихідного гною складає у теплий період року (245 діб) в середньому +20°C; в холодний – +10°C (120 діб). Цей показник визначається окремо для теплового і холодного періоду року за формулами: $\epsilon_{\text{бгу тепл.період}} = C \times Q_{\text{г}} \text{ доб.} \times 245 \times \Delta t$ (25), $\epsilon_{\text{бгу хол.період}} = C \times Q_{\text{г}} \text{ доб.} \times 120 \times \Delta t$ (26), $\epsilon_{\text{бгу річне}} = \epsilon_{\text{бгу тепл.період}} + \epsilon_{\text{бгу хол.період}}$ (27)

5.2 Визначення кількості біогазу, необхідного для підігріву біомаси. Визначається за формулою: $Q_{\text{бг}} = \epsilon_{\text{бгу}} : q$ (28), де: $Q_{\text{бг}}$ – кількість біогазу, необхідного для підігріву біомаси, м³; q – чиста теплотворна здатність біогазу ($q = 22$ МДж/м³)

5.3. Частка біогазу, необхідного для підігріву гною. Визначається за формулою: $\eta_{\text{н}} = Q_{\text{бг}} : V_{\text{г.річне}}$ (29), де: $Q_{\text{бг}}$ – кількість біогазу, необхідна для підігріву біомаси, м³; $V_{\text{г.річне}}$ – річний вихід біогазу, м³.

5.4. Максимально-теоретичний коефіцієнт виходу біогазу. Визначається за формулою: $K_{\text{тб}} = 1 - \eta_{\text{н}}$ (30), де: $K_{\text{тб}}$ – коефіцієнт виходу товарного біогазу.

5.5. Визначення виходу товарного біогазу. Визначається за формулою: $V_{\text{тг}} = V_{\text{г.річне}} \times K_{\text{тб}}$ (31)

6. Оцінка рентабельності біогазового виробництва. Рентабельність біогазового виробництва визначається за деякими технологічними і економічними показниками. До технологічних показників належать: $V_{\text{г}}$ обсяг газогенерації (річний та добовий) та вихід біогазу на 1 гол., 1 кг сухої та органічної речовини, 1 кг гнойової біомаси і 1 м³ корисної площі реактора. Економічна оцінка визначається можливістю одержати з біогазу певну кількість теплової та електроенергії і заміни біогазом природних носіїв енергії.

При проведенні розрахунків необхідно враховувати енергетичні еквіваленти біогазу:

- енергетична цінність 1 м³ біогазу складає 21 МДж;
- 1 м³ біогазу дає можливість виробити 1,6-2,3 кВт/год. електроенергії;
- 1 м³ біогазу еквівалентний енергії, яка міститься в: 0,65 м³ природного газу, 0,7 л нафти, 0,65 л дизельного пального, 0,64 л бензину, 0,6 л керосину, 3,5 кг дров та 1,5 кг кам'яного вугілля.

Висновки:

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

Лабораторна робота №11. Методики розрахунків параметрів проектування потужності вермігосподарств на базі сільськогосподарських підприємств.

Мета: ознайомитись з методикою розрахунків параметрів біоконверсії відходів сільськогосподарського виробництва шляхом вермікультивування.

Завдання: оволодіти методами математичного розрахунку параметрів проектування потужності вермігосподарства на базі конкретних сільськогосподарських підприємств.

Теоретичні основи.

На сьогодні актуальними є питання використання нових біотехнологій для одержання конкурентоспроможної продукції та захисту довкілля від забруднення довкілля тваринницькими, рослинницькими, побутовими та промисловими відходами. Ефективним та екологічно безпечним методом утилізації різних відходів є метод вермікультивування, тобто використання дощових черв'яків, і особливо червоного каліфорнійського гібрида.

З допомогою дощових черв'яків органічні речовини відходів трансформуються у повноцінний білок тваринного походження (біомаса черв'яків) та високоякісне гумусне добриво – біогумус. Біомаса черв'яків використовується у харчуванні людей та годівлі сільськогосподарських тварин, а біогумус – для покращення родючості ґрунтів.

Метод вермікультивування набув широкого розповсюдження у країнах світу Китаї, Японії, Австралії, Франції, США, Італії, Німеччині, Швейцарії тощо.

Ефективність вермікультивування залежить від багатьох факторів, основними з яких є підготовка субстрату (корму) для черв'яків та створення оптимальних умов для їх життєдіяльності (умови утримання, годівлі, тощо). Основу будь якого субстрату складає гній від різних видів сільськогосподарських тварин, який пройшов ферментацію.

Обладнання й матеріали: таблиці з фізіологічними показниками тварин та нормативними даними, формули розрахунків.

Хід роботи. 1. Визначення кількості субстрату для вермікультури та його підготовка.

Як поживне середовище для каліфорнійських черв'яків можна використовувати гній всіх видів сільськогосподарських тварин, який містить усі поживні речовини, необхідні для росту та розвитку олігохет. Тому, в основу проектування потужності вермігосподарства покладено

кількість гнойової біомаси, яка утворюється в господарстві.

Добовий та річний вихід гнойової біомаси розраховується аналогічно, як й у випадку переробки гнойової біомаси в біогаз (лабораторна робота № 10). Відмінним є те, що для вермікультивування використовується твердий гній з вологістю 70-80%, який можна одержати в основному при транспортерній системі гноєвидалення або тверда фракція після сепарування у випадку застосування у господарстві інших систем гноєвидалення. Добрим кормом для черв'яків є тверда фракція або шлам після одержання біогазу, який не потребує спеціальної обробки (ферментації).

1.2. Встановлення строків початку ферментації гнойової біомаси. Важливою ланкою в організації вермікультивування в господарстві є підготовка субстрату (корму) для черв'яків. Кормом можуть бути будь-які органічні відходи (рослинні, харчові, промислові, гнойова біомаса), які пройшли процес ферментації. Роботу з підготовки субстрату (гнойової біомаси) необхідно розпочинати з визначення строку (календарної дати) закладки гною для проходження процесу ферментації (перепрівання). Обумовлено це тим, що тривалість ферментації гною залежить від виду тварин (табл. 15), а максимальний термін зберігання проферментованого гною у буртах – не більше 2-х років.

Таблиця 15. Час ферментації гнойової біомаси від різних видів тварин

Гній	Час ферментації, місяців
Коней	5-6
ВРХ: корови	6-7
Молодняку ВРХ	10-11
Овець	3-4
Свиней	9-10
Кролів	0-4
Птиці	16-19

1.3. Визначення площі під бурти для ферментації гнойової біомаси. Для проведення ферментації гнойової біомаси її буртують на площадці з допустимим нахилом 1-3°. Бурти можуть мати різні розміри: ширина – 1,7-2,0, довжина 15-80 і висота 1,5-2,0 м. Це залежить від наявної робочої сили і засобів механізації. Розміщують їх із півночі на південь.

Час саморозігріву у буртах літом 7-10 діб, а зимою – 10-15 діб. Ферментація гною проходить у двох режимах – спочатку у мезофільному,

а потім – термофільному (до 60°C). Така температура утримується 5–10 діб. Вона згубно діє на патогенні мікроорганізми, яйця та личинки гельмінтів, насіння бур'янів. У подальшому компостування проходить знову у мезофільному режимі ($t = 25\text{--}35^\circ\text{C}$).

Площа під бурти для ферментації гнойової біомаси визначається за формулою:

$$S_6 = Q_{\Gamma} \cdot K \quad (32)$$

де: S_6 – площа під бурти для ферментації гнойової біомаси, м^2 ; Q_{Γ} – річний вихід гною, K – коефіцієнт, який враховує час ферментації і додаткову лошу на проїзд техніки буртами (табл. 16).

Таблиця 16. Коефіцієнт, який враховує час ферментації і площу на проїзд між буртами

Вид тварин	Коефіцієнт (K)
Корови	1
Коні	1
Вівці	0,5
Кури	2,5
Свині	2,0
Телята	2,0

1.4. Визначення маси добавки природних мінералів до субстрату. Для забезпечення потреби черв'яків у мікромінеральних факторах живлення, до субстрату необхідно вносити різні мінеральні домішки – глину, фекалії, цеоліт, сапоніт, крейду тощо у дозі до 4% від загальної маси субстрату. Це також сприяє оптимізації рН середовища, кращому гумусоутворенню.

Кількість мінеральних речовин визначається за формулою:

$$K_M = (Q_{\Gamma} \cdot M_M) : 100 \quad (33)$$

де: K_M – маса природних мінералів на рік, т; Q_{Γ} – річна маса гною, яка може бути субстратом для черв'яків, тонн; M_M – кількість мінеральної добавки, % (4).

1.5. Визначення маси субстрату із природними мінералами.

Визначається за формулою:

$$Q_{\text{см}} = Q_{\Gamma} + K_M \quad (34)$$

де: $Q_{\text{см}}$ – маса субстрату з мінеральними добавками, т; Q_{Γ} – гнойова біомаса за рік, т; K_M – маса природних мінералів на рік, тонн.

1.6. Визначення кількості речовин, багатих на целюлозу, при використанні як субстрат посліду птиці. Показником готовності субстрату

до згодовування черв'якам є співвідношення Карбону до Нітрогену (C:N), яке має бути в межах 20. Послід птиці містить значну кількість Нітрогену – 2,0-6,0% від сухої речовини, вміст клітковини становить лише 13–15%. Для того, щоб забезпечити співвідношення C:N 20:1, або вмісту целюлози 20-25%, до посліду птиці додають солому, полову, лушпиння насіння соняшнику, папір тощо, тобто компоненти, багаті на Карбон. Можна використовувати також тирсу, за виключенням тирси хвойних порід.

Кількість відходів, багатих на клітковину, яку необхідно додати до гнойової біомаси, визначається за формулою:

$$M_k = (Q_g - C) : 100 \quad (35)$$

де: M_k – маса речовин багатих на клітковину, т; Q_g – гнойова біомаса за рік або період, т; C – відсоток введення речовин, багатих на клітковину, % (10-30%).

1.7. Визначення маси субстрату із речовинами, багатими на клітковину, при використанні посліду птиці. Визначається за формулою:

$$Q_{ск} = Q_{с.м} + M_k \quad (36)$$

де: $Q_{ск}$ – маса готового субстрату із посліду птиці, т; $Q_{с.м}$ – маса субстрату з мінеральними добавками, т; M_k – кількість речовин, багатих, на клітковину, т.

2. Розрахунок основних параметрів формування лож.

Ложе – це площа субстрату., заселена черв'яками, розміром у 2 м² (2м х 1м). Це визначення покладено в основу вимірів і перейшло від американських дослідників, які вперше проводили дослідження з біотехнології вермикультивування.

2.1. Визначення кількості базового субстрату.

Базовий субстрат – це першопочатковий субстрат, який закладаються в нові лежа. При формуванні лож у господарстві, в них закладають відходи, які пройшли ферментацію базовим субстратом. Він виконує різні функції: захищає черв'яків від підстильного ґрунту і тому товщина його коливається від 15 см влітку до 25-30 см взимку. Крім цього, базовий субстрат з кормом для черв'яків повинен мати достатню кількість целюлози (20-25%), оптимальну вологість (70-80%), температуру (19-20°C) та рН (6,8-7,2), а також треба його дослідити тестом 50 черв'яків. Суть тесту полягає у тому, що в ящики розміром 50х60х15 або у 2-4 літрову скляну ємність закладають базовий субстрат та 50-ма черв'яками і витримують 24 години за 20°C. Потім черв'яків вибирають, підраховують та візуально визначають їх стан. Якщо усі черв'яки живі і нормально рухливі, то це є свідченням придатності субстрату для живлення черв'яків. Тільки після цього лежа з основним субстратом заселяють черв'яками.

2.2. Визначення виходу базового субстрату за рік. Формування (закладка) лож розпочинається визначенням перш за все вихідної кількості базового субстрату, який буде у господарстві. Визначається за формулою:

$$M_{\text{бср}} = (Q_{\text{с.м}} \cdot K_6) : 100 \quad (37)$$

де: $M_{\text{бср}}$ – маса базового субстрату за рік, т; $Q_{\text{с.м}}$ – загальна маса про ферментованого субстрату (відходів з мінеральними добавками), тонн; K_6 – кількість базового субстрату від загальної маси про ферментованого субстрату, % в середньому (35-40%).

2.3. Визначення кількості базового субстрату для закладки перших лож. Кількість базового субстрату, необхідного для закладки перших лож, залежить від загальної маси базового субстрату та від того, сезонне чи цілорічне вермікультивування у господарстві. При цілорічному вермікультивуванні у квітні проводиться перше 3-разове розділення лож (формування нових лож із попередніх); друге розділення – липневе 2-разове, а в жовтні проводиться 3-разове розділення лож, які були закладені в квітні місяці, і 4-разове – сформованих у липні.

Визначається за формулою:

$$B_c = M_{\text{бср}} : n \quad (38)$$

де: B_c – кількість базового субстрату, який використовують для закладки перших лож, тонн; $M_{\text{бср}}$ – маса базового субстрату за рік, тонн; n – коефіцієнт, який враховує кратність розділення одного ложа: при цілорічному вермікультивуванні $n=17$, а сезонному – $n=11$.

2.4. Визначення кількості базового субстрату при використанні посліду птиці за рік. Визначається за формулою:

$$M_{\text{бср}} = (Q_{\text{с.к}} \cdot K_6) : 100 \quad (39)$$

де: $M_{\text{бср}}$ – маса базового субстрату за рік при використанні посліду птиці, тонн; $Q_{\text{с.к}}$ – маса субстрату із посліду птиці, тонн; K_6 – відсоток, який припадає на базовий субстрат, % (35-40).

2.5. Розрахунок кількості лож. Розрахунок кількості лож проводиться за формулою:

$$K_{\text{л1}} = B_c : M_{B_c} \quad (40)$$

де: $K_{\text{л1}}$ – кількість лож, яка необхідна для початку роботи, шт; B_c – кількість базового субстрату, який використовують для закладки перших лож, т; M_{B_c} – маса базового субстрату, який настиляють першим шаром на одне ложе (0,34-0,57 тонн) залежно від висоти шару.

$$K_{\text{л}} = (B_c : M_{B_c}) \cdot k \quad (41)$$

де: $K_{\text{л}}$ – кількість лож, які необхідно закласти за рік, шт.; B_c – кількість базового субстрату, який використовують для закладки перших

лож, тонн; $M_{Бс}$ – маса базового субстрату, який настиляють першим шаром на одне ложе (0,34-0,57 тонн); k – коефіцієнт, який враховує розділення лож ($k = 11$ або $k = 17$).

2.6. Розрахунок площі під ложа. При визначенні, яку площу необхідно планувати під ложа, необхідно брати до уваги площу самого ложа, а також спосіб вирощування каліфорнійських черв'яків. Черв'яків можна вирощувати на відкритому ґрунті, коли бурти закладають поверх розстеленої на землі сітки або у приміщенні, де ложа розміщують ярусами. Визначається за формулою:

$$S_{л} = K_{л} \cdot k \quad (42)$$

де $S_{л}$ – площа під ложа, m^2 ; $K_{л}$ – кількість річних лож, шт.; k – коефіцієнт, який враховує особливості технології (табл. 17)

Таблиця 17. Показник, який враховує особливості технології вермікультивування

Спосіб розміщення лож	Коефіцієнт (k)
На відкритому ґрунті	4
В приміщенні (2 яруси)	2
В приміщенні (3 яруси)	1

2.7. Розрахунок площі сітки під ложа на відкритому ґрунті. Черв'яки – малозахищені істоти, їх добре поїдають кроти. З метою запобігання потрапляння у ложа із черв'яками кротів, ґрунт, на якому розміщують бурт із субстратом, вистилають сіткою із розміром вічок 1,5х1,6см. Площа сітки обчислюється за формулою:

$$S_{с} = K_{л} \cdot 2,2 \quad (43)$$

де: $S_{с}$ – площа сітки, m^2 ; $K_{л}$ – кількість лож, шт.; 2,2 – коефіцієнт, який враховує площу ложа, а також загинання сітки по краях.

2.8. Розрахунок площі під стелажі. Розрахунок площі стелажів проводять за такою формулою:

$$S_{ст} = K_{л} \cdot 2 \quad (44)$$

де: $S_{ст}$ – площа стелажів, m^2 ; $K_{л}$ – кількість лож, шт.; 2 – площа одного ложа, m^2 .

3. Годівля черв'яків та закладка маточного поголів'я в субстрат.

3.1. Розрахунок кількості субстрату для годівлі черв'яків. Через 20–25 діб після заселення черв'яків проводять першу підкормку, тобто внесення нових порцій субстрату, а потім регулярно через кожні 7–10 діб вносять нові порції корму шаром 5–7 см. Підкормка повинні бути перевірена на якість, в тому числі і за тестуванням 50-ти черв'яків.

3.1.1. Кількість підкормки, яку вносять до розділення лож. Розрахунки проводять за формулою:

$$Q_n = (K_{л1} \cdot K_n) \cdot M_n \quad (45)$$

де: Q_n – маса субстрату, який використовується для підкормки, тонн; K_n – кількість підкормок з квітня по липень: 10 (з інтервалом в 7 діб), 7 (з інтервалом в 10 діб); M_n – маса підкормки на одне ложе (0,114-0,159 тонн); $K_{л1}$ – кількість лож, яка необхідна для початку роботи.

3.1.2. Кількість підкормки, яку вносять на всі лежа (за сезон, рік). Визначається за формулою:

$$Q_{п1} = (K_{л} \cdot K_{п1}) \cdot M_n \quad (46)$$

де: $Q_{п1}$ – маса підкормки, яку вносять на усі лежа, $K_{л}$ – кількість лож по вермігосподарству, шт.; $K_{п1}$ – кількість підкормок (9-14), шт.; M_n – маса підкормки (0,114-0,159), тонн.

3.2. Заселення субстрату черв'яками.

3.2.1. Кількість маточного поголів'я черв'яків для заселення початкових лож у квітні. На одне ложе 2 м² заселяють різну кількість черв'яків (від 5 до 30 тис. шт.). Від пари черв'яків можна одержати до 1500 молодих особин за рік.

Кількість черв'яків для заселення початкових лож визначається за формулою:

$$K_q = K_{л1} \cdot N_3 \quad (47)$$

де: K_q – кількість черв'яків для заселення, шт.; $K_{л1}$ – кількість лож на початку роботи, шт.; N_3 норма заселення на 2 м² (4, 5, 6, 7... і т.д.).

3.2.2. Кількість черв'яків для заселення усіх лож у вермігосподарстві. При визначенні кількості черв'яків, якими необхідно заселити усі лежа, враховують кількість лож, які плануються в господарстві за рік, і норму заселення:

$$K_{ч1} = K_{л} \cdot N_3 \quad (48)$$

де: $K_{ч1}$ – кількість черв'яків для заселення усіх лож в господарстві, шт.; $K_{л}$ – кількість лож по всьому вермігосподарству; N_3 – норма заселення одного лежа (4 – 30 тис.).

4. Одержання біотехнологічної продукції – черв'ячної біомаси та біогумусу.

4.1. Визначення кількості біогумусу, одержаного із квітневих лож. Біогумус – продукт переробки органічних відходів червоними каліфорнійськими черв'яками. Накопичення його у ложі проходить поступово, час дозрівання біогумусу становить близько 6 місяців. Враховуючи те, що із однієї тонни субстрату виходить 50-60% біогумусу, коефіцієнт трансформації становить 0,5 – 0,6. Визначається за формулою:

$$B_i = (B_c + Q_n) K_T \quad (49)$$

де: B_i – маса біогумусу, тонн; B_c – маса базового субстрату, який використовується для закладки перших лож, тонн; K_T – коефіцієнт трансформації (0,5-0,6); Q_n – маса субстрату, який використовується для підкормки.

4.2. Визначення кількості біогумусу, який можливо одержати при переробці усього субстрату за рік. Для визначення цього показника необхідно сумувати масу базового субстрату, а також масу підкормки, яку використовуємо для вермікультивування на протязі сезону. Субстрат, який згодовували у липні – жовтні, у квітні вже буде готовим біогумусом. Визначення за формулою:

$$B_{ip} = (M_{бср} + Q_{п1}) K_T \quad (50)$$

де: B_{ip} – кількість біогумусу, яку можливо отримати при переробці накладеного субстрату, тонн; $M_{бср}$ – маса базового субстрату за рік., тонн; $Q_{п1}$ – маса підкормки за рік, сезон, тонн; K_T – коефіцієнт трансформації (0,5-0,6).

4.3. Визначення **кількості** черв'яків, які одержуємо за сезон. Враховуючи те, що одна особина може дати до 700 штук черв'яків за рік, то за сезон з квітня по жовтень (6 міс.) цей показник становить 300–350 штук. Визначення цього показника проводимо із врахуванням початкової кількості черв'яків, яку заселили у квітні. Розрахунок проводиться за формулою:

$$K_{чз} = K_{ч} P_v \quad (51)$$

де: $K_{чз}$ – кількість одержаних черпаків за сезон в господарстві, виходячи із початкової кількості заселення лож, шт.; $K_{ч}$ – кількість черв'яків для заселення, шт.; P_v – кількість потомства від одного черв'яка за сезон (300–350), шт.

4.4. Визначений **кількості** черв'ячної біомаси, яку можна використовувати для годівлі сільськогосподарських тварин та птиці. Враховуючи те, що для статевого дозрівання черв'яків необхідно 90–100 діб, то черв'яки, які народились в квітні, можуть давати нащадки. Щоб визначити масу черв'яків, яку можна використати для годівлі тварин, вирахуємо різницю між кількістю черв'яків, яка утвориться за сезон та тією кількістю, яка необхідна для заселення усіх лож у господарстві (маточним поголів'ям). Визначається за формулою:

$$M_{чб} = (K_{чз} - K_{ч1}) m_{ч} \quad (52)$$

де: $M_{чб}$ – маса черв'яків, яку можна використовувати для годівлі сільськогосподарських тварин; $K_{чз}$ – кількість черв'яків, які утворились із квітневих лож за сезон, шт.; $K_{ч1}$ – кількість черв'яків для заселення усіх лож в господарстві, шт.; $m_{ч}$ – середня маса одного черв'яка (з

урахуванням того, що в залежності від віку їх маса різниться) 0,00035-0,0008 кг.

5. Використання черв'ячної біомаси у живленні сільськогосподарських тварин.

5.1. Визначення поголів'я тварин і птиці, яким можна згодовувати черв'ячну біомасу. Черв'ячна біомаса багата на білок, в 1 кг сухої речовини міститься 60-86% білка, який є біологічно повноцінним, оскільки містить усі незамінні амінокислоти. Її можна використовувати як білкову домішку до раціонів. Черв'яків можна згодовувати ВРХ, свиням, птиці, рибі як в сирому, так й вареному вигляді, а також у вигляді борошна. Норма споживання повноцінного білка повинна становити 10% від загальної кількості білка та повністю задовольняється при додаванні в корм 1 г черв'яків на 1 кг живої маси на добу. Введення в раціони черв'ячної біомаси призводить до підвищення продуктивності тварин і птиці до 25%. Розраховується за формулою:

$$n_j = M_{чб} : m_z \quad (53)$$

де: n_j – поголів'я тварин та птиці, гол.; $M_{чб}$ – маса черв'яків, що можна використовувати для годівлі тварин, кг; m_z – маса черв'яків, яку можна згодовувати одній голові за рік, період відгодівлі (табл. 18).

Таблиця 18. Допустимі норми згодовування черв'ячної біомаси для сільськогосподарських тварин та птиці

Вид тварин	Маса черв'яків на голову, кг	
	За рік	За період підгодівлі
Корови, нетелі, ВРХ на відгодівлі	18-90	-
Свині	7,3-10,9	3,2-5,0
Доросла птиця	0,73-1	-
Курчата-бройлери	-	0,1-0,16

5.2. Вихід білкового борошна та черв'ячної біомаси. З метою поліпшення технологічності використання черв'ячної біомаси, з неї доцільно одержувати білкове борошно. До складу білкового борошна входить 70% білка, 7-8% жиру. Визначається за формулою:

$$ЧБ = M_{чб} \cdot Кб \quad (54)$$

де: ЧБ – вихід черв'ячного борошна, кг; $M_{чб}$ – маса черв'яків, яку можна використовувати для годівлі і тварин, кг; Кб – коефіцієнт виходу черв'ячного борошна (0,18–0,23).

5.3. Одержання повноцінних білків за рахунок черв'ячної біомаси. Білки рослинного походження, які одержують тварини із кормом (зернові,

злакові, бобові), мають меншу біологічну повноцінність, ніж білки тваринного походження. Виробляючи борошно із черв'яків, білок якого за амінокислотним складом аналогічний білку м'ясо-кісткового і рибного борошна, господарство спроможне буде замінити ним дорогі та дефіцитні корми тваринного походження – рибне, м'ясне борошно, сухе молоко тощо. Визначення проводиться за формулою:

$$\text{ПБм} = (\text{ЧБ} - \text{ВБ}) : 100 \quad (55)$$

де: ПБ_ч – маса повноцінних білків, одержаних із черв'ячної біомаси, кг; ЧБ – вихід черв'ячного борошна, кг; ВБ – вміст білка у черв'ячному борошні (55–70%).

Висновки:

Дата: “ _____ ” _____ 20__ р.

Лабораторна робота № 12

Біоконверсія відходів сільськогосподарського виробництва у біопаливо

Мета: ознайомитись з видами біопалива та технологіями його виробництва.

Завдання: ознайомитись з технологічними процесами виробництва біодизельного палива з насіння та рідкого біопалива із сільськогосподарських відходів.

Теоретичне обґрунтування

Як альтернативні види палива сьогодні розглядають стиснений природний газ (метан), нафтовий газ (пропан + бутан), водень, спирти (метанол, етанол), а також рідке паливо, яке отримують з вугілля або при переробці рослинної сировини. Саме до цієї групи відноситься біопаливо.

Біопаливо – це паливо із біологічної сировини, як правило з відходів сільськогосподарського виробництва. Розрізняють *рідке біопаливо* (для двигунів внутрішнього згорання, наприклад, біоетанол, біодизель) і *тверде біопаливо* (дрова, солома та ін.). Різноманітні органічні матеріали, що виділяють у процесі розпаду тепло, яке використовується для обігріву приміщень, теплиць, парників теж відносять до біологічного палива. Як

біопаливо використовують після переробки гній (корів, овець, свиней), побутові відходи, кору дерев, відходи текстильної промисловості, тирсу.

Середній врожай сухої маси сіна становить приблизно 15 т/га. Передбачаючи, що енергетична цінність 1 кг кам'яного вугілля становить 25 МДж, навіть при низькому врожаї трав, що становить 5 т/га, з одного гектару можна отримати еквівалент 3 т кам'яного вугілля. Натомість зібраний врожай біомаси на рівні 20 т/га дає еквівалент 12 т кам'яного вугілля. Спалювання біомаси для опалювання приміщень, поширене у багатьох країнах є економічно вигідним у відношенні до опалювання мазутом, газом чи струмом.

Паливні гранули (пелети) – це біопаливо, яке виробляється з деревних і сільськогосподарських відходів та застосовується для опалення приміщень. Виробляються у вигляді пресованих гранул стандартного розміру з вмістом золи не більше 3%, мають більшу теплотворну здатність порівняно з дровами. При спалюванні пелет в атмосферу викидається рівно стільки CO_2 , скільки було поглинуто рослиною в період росту. Паливні гранули не здатні до самозапалювання, тому що не містять пилу та спор.

Технологія виробництва паливних гранул.

Спочатку сировина подрібнюється до стану борошна в дробарці. Отримана маса висушується та гранулюється у прес-грануляторі. На виробництво 1 т паливних гранул витрачається 4-5 кубометрів деревних відходів. Готові гранули охолоджують і упаковують в стандартну тару по 12-20 кг.

Біодизельне паливо (БДП) – це екологічно чистий вид біопалива, який одержують із жирів рослинного і тваринного походження та використовують для заміни нафтового дизельного палива. З хімічної точки зору, біодизельне паливо є сумішшю метилових (етилових) ефірів насичених і ненасичених жирних кислот.

Переваги БДП:

- є відновлювальним і екологічно чистим джерелом енергії;
- при потраплянні в ґрунт чи воду не завдає шкоди, бо переробляється мікроорганізмами впродовж трьох-чотирьох тижнів;
- має значно кращі мастильні властивості ніж дизельне паливо, тому зменшує зношуваність двигуна і подовжує термін його роботи;
- нескладне виробництво;
- підвищена майже втричі температура спалаху в закритому тиглі забезпечує високу пожежобезпечність;
- високе цетанове число сприяє скороченню періоду затримки спалаху й пом'якшує роботу дизельного двигуна;

- може використовуватись у чистому вигляді, або змішаним;
- біодизель майже не містить сірки ($< 0,001\%$).

Недоліки БДП:

- має температуру замерзання на кілька градусів вищу ніж дизельне паливо. Тому за низьких температур у БДП треба додавати добавки, що знижують температуру замерзання;
- агресивно діє на натуральні гуми та деякі еластомери (полівініл, поліамід);
- має короткий термін придатності – три, чотири місяці;
- потребує додаткового очищення від домішок парафіну;
- втрати енергетичних параметрів при робочому навантаженні двигуна становить 4-5%, а втрати пального зростають на 6-7%;
- у перші місяці користування біодизельним паливом треба періодично контролювати стан паливних фільтрів.
- в продуктах згорання БДП у десятки разів більше канцерогенних речовин, ніж у паливі з поліпшеними екологічними властивостями.

Порівняльна характеристика дизельного і біодизельного палива наведена в табл.19.

Таблиця 19. Порівняльна характеристика мінерального і рослинного дизельного палива

Характеристики	Дизельне паливо	Біодизельне паливо
Густина, г/см ³	0,92	0,88
Цетанове число	48-50	54-56
Температура запалювання, °С	60	160
Температура блокування фільтру, °С	-12	10
Вміст сірки, %	0,28	0,01
В'язкість	2,5-4	3,5-5

Біодизельне паливо отримують із рослинних олій шляхом реакції переестерифікації. Основні реагенти: рослинна олія, метанол, каталізатор (KOH). У процесі переестерифікації олії, жири вступають у реакцію з метиловим (етиловим) спиртом в присутності каталізатора (лугу), внаслідок чого утворюються *складні ефіри і гліцерінова фаза*: 56% гліцерину; 4% метанолу; 13% жирних кислот; 8% води; 9% неорганічних солей; 10% ефірів.

Матеріальний баланс реакції одержання біодизельного палива.

Для одержання 1000 кг (1136 л) біодизельного палива необхідно:

- 50 кВт теплової енергії;
- 25 кВт електроенергії;
- 1040 кг (1143 л) ріпакової олії;
- 144 кг (132 л) 99,8% метанолу;
- 18 кг гідроксиду калію (88% КОН);
- 6 кг допоміжного фільтруючого матеріалу;
- 105 кг води.

При цьому, крім палива, утворюється близько 200 кг сирого гліцерину та 117 кг води після очищення біодизельного палива.

Сирий гліцерин, в подальшому, застосовується для виробництва гліцерину дистильованого, монофосфат калію – для виробництва рідких комплексних мінеральних добрив.

Вимоги до насіння ріпаку і ріпакової олії, дотримання яких дозволить одержати біодизельне паливо, що відповідає стандарту, такі:

Очищене насіння ріпаку – олійність 40-44%; вологість близько 6-7%; вміст вільних жирних кислот < 3% (6 мг КОН/г); температура насіння 20-30°C; забруднення близько 0,5%.

Холоднопресована, фільтрована ріпакова олія – йодне число 110-115; вологість максимум 0,05%; вміст вільних жирних кислот максимум 0,65% (1,3 мг КОН/г); пероксидне число 1-2 (максимум 3); забруднення немає; число омилення 187-191; фосфатиди максимум 20 мг/кг; температура 20°C.

Технологічний процес виробництва біодизельного палива з насіння відбувається у декілька етапів (рис.3): насіння з шнекового конвеєру проходить крізь відділювач грубих домішок і крізь магнітний пристрій для відділення металевих домішок у насипні лійки пресів.

Отримана пресуванням рослинна олія накопичується у збірній ємності. Очищення від фосфатидів та інших гідратованих речовин відбувається в гідраторі. Олія спочатку проходить обробку фосфорною кислотою, а після цього гарячою водою. При обробці видаляються всі важкі метали та інші шкідливі домішки.

Після обробки олія надходить у 1-й етерифікатор, де підігрівається до необхідної температури. Одночасно готується суміш метанолу з лугом і дозується у 1-й етерифікатор. При досягненні необхідної температури відбувається змішування каталізатору з олією. Після обробки, первинний дизель залишають на 90 хвилин для відстоювання і зливають утворену гліцеринову фазу. Вторинний біодизель завантажують у 2-й етерифікатор. Після 90 хвилин відстоювання знову зливають гліцеринову фазу та визначають ступінь етерифікації біодизелю. Якщо вміст гліцеридів в

нормі, виконують промивання біодизелю. Готовий біодизель фільтрується і надходить у ємність для готової продукції.

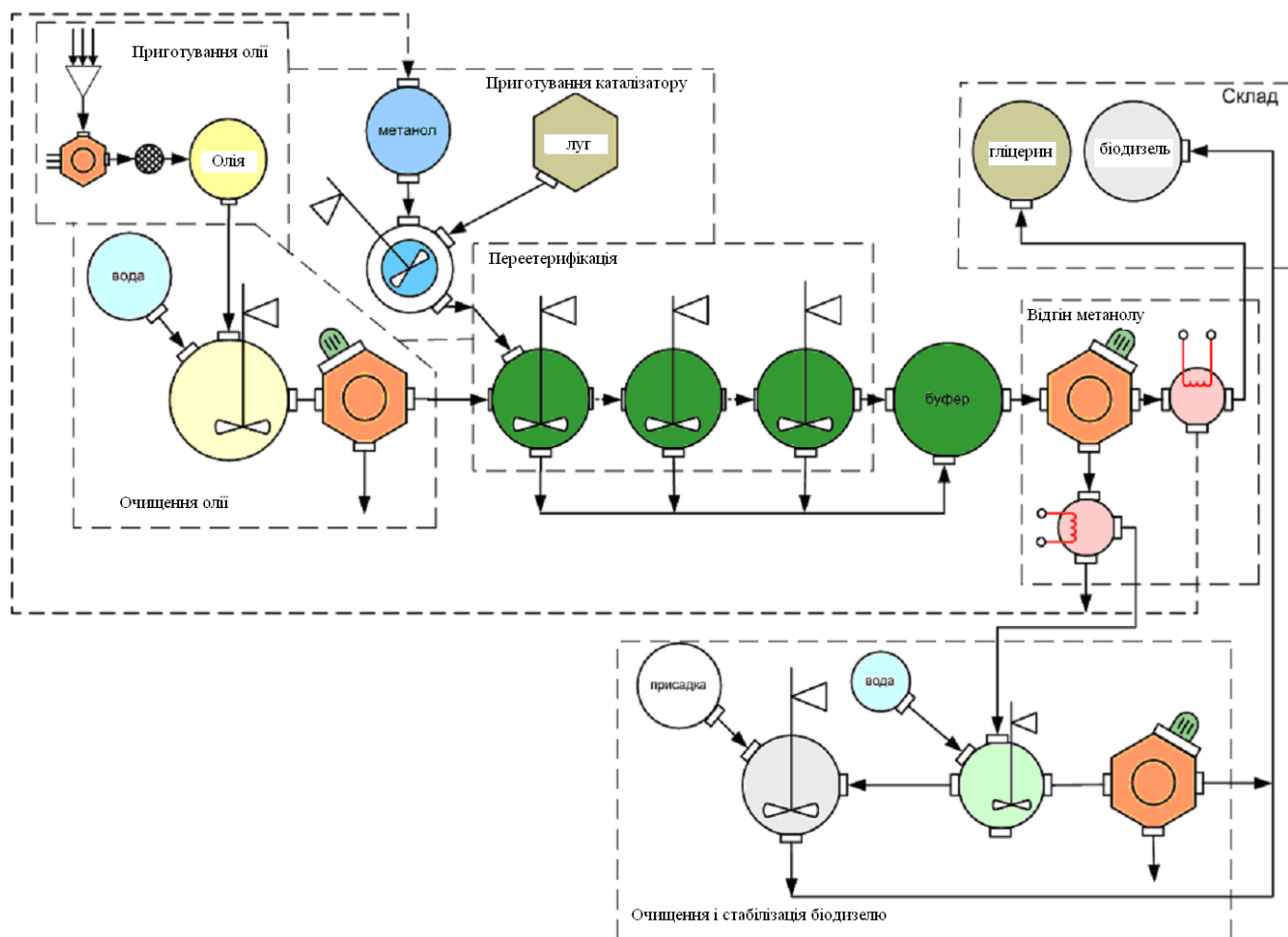


Рис.3. Блок-схема виробництва біодизельного палива з насіння

Технологічний процес виробництва біодизельного палива з олій відбувається наступним чином: рослинна олія з ємності 1 (рис.4) крізь поточний нагрівач ПН та фільтр Ф1 насосом Н1 подається у гідродинамічний змішувач Зм.

Витрата олій контролюється витратоміром R1. У вакуумну порожнину гідродинамічного змішувача, крізь фільтр Ф2, витратомір R2 та вентиль регулювання ВР, з ємності 3 поступає, попередньо приготовлений, розчин каталізатору в спирті (КОН у метанолі).

Завдяки інтенсивним гідродинамічним процесам в гідродинамічному змішувачі та механічному змішувачі відбувається розривання молекул жирних кислот, що значно підвищує швидкість протікання реакції та покращує якість енергетичних характеристик майбутнього палива.

Після механічного змішування суміш подається у колонки-відстійники 4, де відбувається її розділення на біодизельне паливо і

водно-гліцерину суміш. Готове паливо насосом НЗ через фільтр - відокремлювач поступає на накопичення.

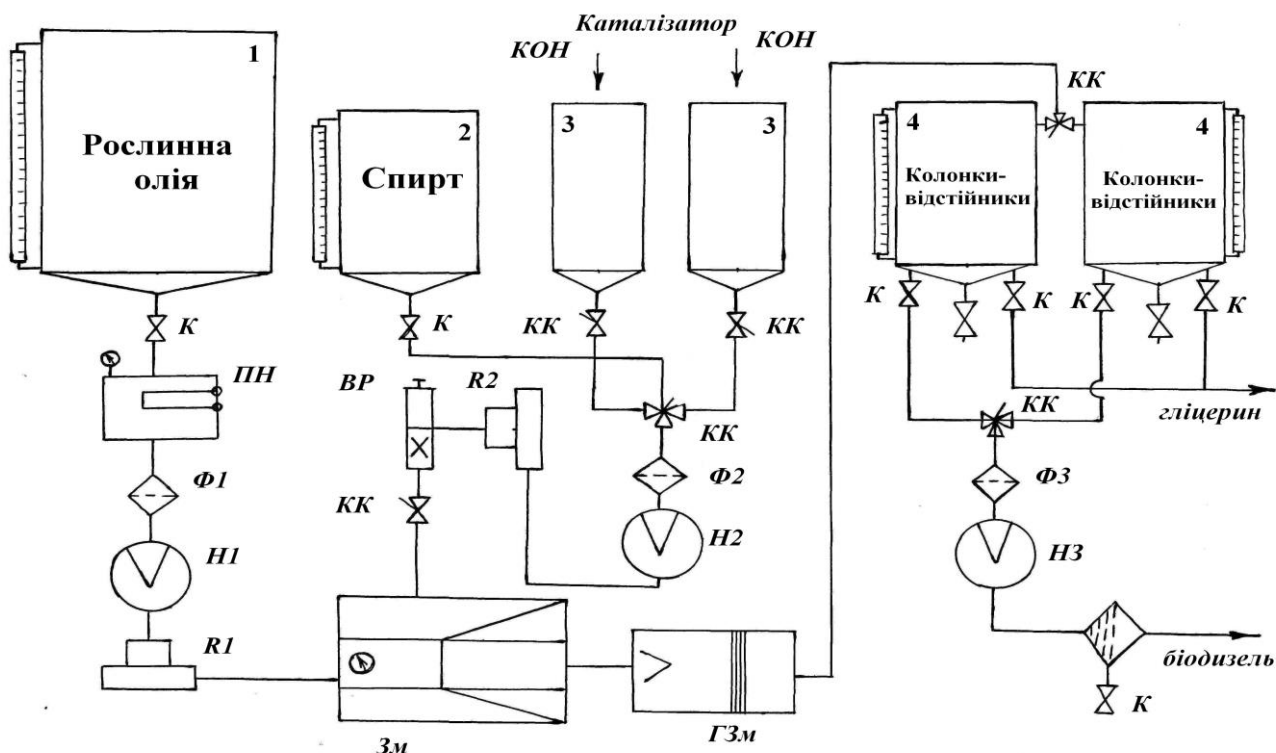


Рис.4. Схема виробництва біодизельного палива з олії в потоці:

1-ємність для рослинної олії; 2- ємність для спирту; 3- ємність для каталізатору; 4- колонки-відстійники; ПН – поточний нагрівач; Ф – фільтр; Н – насос; Зм – гідродинамічний змішувач; R – витратомір; ВР – вентиль регулювання; ГЗм – гідромеханічний змішувач, КК – клапан керування, К – клапан.

В результаті проведення реакції переестерифікації в 2-х ступеневому змішувачі (гідродинамічному і механічному) відбувається повна витрата метанолу, яка не перевищує 12-13%. Реакція в гідродинамічному змішувачі відбувається нормально при температурі 40-50⁰С. Технічна характеристика установки безперервного процесу виробництва біодизельного палива наведена в табл.18.

Біопаливо в Європі виготовляють за схожою технологією, але майже на всіх етапах технологічного процесу продукт очищують (і отриману олію, і етерифікат). В процесі виробництва із сировини отримують олію, очищують її від сторонніх домішок, напівфабрикат нагрівають, охолоджують та дистиллюють. Залишки їдкого калію та отруйного метанолу промивають водою.

Таблиця 20. Технічна характеристика установки безперервного процесу виробництва біодизельного палива

№	Найменування параметру	Значення
1	Продуктивність за вихідною сировиною (олією, жиром), $\text{дм}^3/\text{хв}$	8...14
2	Витрата суміші метанолу з каталізатором, $\text{дм}^3/\text{хв}$	0,1...0,3
3	Об'єм бака для олій, дм^3	50
4	Об'єм бака для метанолу, дм^3	12
5	Об'єм бака для отриманого продукту, дм^3	30
6	Температура нагріву і температура підтримання олії і метанолу, $^{\circ}\text{C}$	40...70
7	Потужність нагрівачів, кВт	1,5
8	Потужність електродвигунів, насосів, кВт	2,8
9	Повна потужність, кВт, не більше	4,5
10	Габаритні розміри, мм не більше - довжина - ширина - висота	865 755 1250
11	Маса установки, кг, не більше	250

Технологія виробництва рідкого біопалива із сільськогосподарських відходів. Сировиною для цього процесу є – шматки деревини, солома, гній. Після накопичення і тимчасового сушіння, сировина поступає у реактор, де нагрівається до $400-500^{\circ}\text{C}$ з додаванням каталізатору. Газ, що виділився в результаті нагрівання, проходить ряд перетворень у присутності каталізатору. Отримане, на виході з реактору, біопаливо не містить сірки та CO_2 нейтральне по відношенню до оточуючого середовища.

Синтетичне біопаливо (СБП) – суміш синтетичних вуглеводнів отриманих з біомаси.

Сучасні технології переробки вуглеводів дозволяють виробляти синтетичне дизельне пальне та синтетичний бензин. Як сировина використовуються відходи деревообробної промисловості, сільського господарства, побутові відходи, сміття. Особливість цих технологічних процесів – отримання з одного виду сировини різних видів палива.

Переваги СБП:

- можливість отримання необхідних характеристик палива;

- відсутність сірки;
- викиди шкідливих речовин нижчі, ніж при застосуванні «нафтового» пального;
- необмежені запаси сировини.

Недоліки СБП:

- високі витрати енергії на виробництво пального;
- необхідні значні капіталовкладення для створення підприємств з випуску синтетичного палива та створення системи накопичення, поставки і підготовки сировини.

Перше в світі синтетичне біопаливо, у 2003 році, розробила компанія *DaimlerChrysler*. Нове паливо, під назвою *Biotroll*, виробляється з деревних відходів.

Висновки:

Контрольні питання.

1. Яке значення має біоконверсія відходів сільськогосподарського виробництва? _____

2. В чому суть біоконверсії? _____

3. У чому полягає загальна характеристика технології біоконверсії. _____

4. Охарактеризуйте основні типи взаємовідношень компонентів біоконверсії. _____

5. Дайте порівняльну характеристику аеробної й анаеробної переробки відходів сільськогосподарського виробництва. _____

6. Які основні принципи виробництва біогазу? _____

7. Які фактори є важливими для ефективного процесу одержання біогазу?

9. Охарактеризуйте мікробіологічні процеси, що лежать в основі одержання біогазу.

10. Дайте характеристику мікрофлорі анаеробного метанового бродіння.

11. Охарактеризуйте біохімічні процеси, що лежать в основі одержання біогазу.

12. Охарактеризуйте технологічну схему одержання біогазу.

13. Які особливості біотехнології вермикультивування?

14. Опишіть біологічні особливості дощових черв'яків та способи їх вирощування.

15. Біогумус його склад та використання.

Роботу прийняв _____ (підпис викладача)

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Никифорова В. В. Кременчук: ПП Щербатих О.В., Галузі сучасної біотехнології. 2021 184 с
2. Галузі сучасної біотехнології /Підручник за редакцією: Никифоров В. В. Кременчук: ПП Щербатих О.В, 2021. 184 с.
3. Захаренко М. О., Яремчук О. С., Шевченко Л. В. Гігієна та біоферментація побічних продуктів тваринництва: монографія. Київ: Центр учбової літератури, 2017. 536 с.
- 4 Носенко Ю. Біогаз – реальна альтернатива природному газу? URL: <http://www.agro-business.com.ua/ideii-i-trendy/3701-biogaz-realna-alternatyva-pryrodnomu-gazu.html>
5. Екологічна біотехнологія / Швед О. В. та ін.: навч. посіб. у двох книгах. Львів: Видавництво Львівської політехніки, 2018. 424 с.
6. Альтернативна поновлювана енергетика та біоконверсія: навчальний посібник / [уклад. Буцяк В.І., Шемедюк Н.П., Ромашко І.С., Горчин С.В., Двилюк І.І.]. Львів: ЛНУВМБ імені С.З. Ґжицького, 2023. 293 с.
7. Усенко С.О., Васильєва О.О. Біотехнологія та відтворення тварин: навч. посіб. Полтава: РВВ ПДАА, 2020. 107 с.
8. English for Biology and Bioengineering: навч. посібник / О. Поліщук. К.: ЦП «Компринт», 2017. 200 с.
9. Основи біотехнології. Буцяк В.І., Колотницький А.Г., Буцяк Г.А. навч. посіб. Львів: Тріада плюс, 2011, 395 с.
10. Біотехнологія: навч. посіб. / О. І. Юлевич, та ін.С. Миколаїв: МДАУ, 2012. 476 с
11. Butsyak A., Butsyak V., Shved O., Hubrii Z. Analysis of the adsorbents use for local reduction of toxic load with heavy metal// Health and nanobio-technology. Human health: realities and prospects monographic series, 2020. V. 5. P. 88-104.
12. Петрух, І.М. Буцяк В.І. Сімонов М.Р.. Протеїновий обмін та ензимна активність у високопродуктивних молочних корів за метаболічних порушень/ НТБ ДНДКІ ветпрепаратів і кормових добавок і Інституту біології тварин.Вип.20, №1. Львів, 2019. С.14-21.
13. Альтернативне використання субстратів опалого листя у вермикультивуванні. Буцяк Г.А., Гавриляк В.В., Швед О.В., Буцяк В.І. *Вісник НУ "Львівська Політехніка"*, 2018. V.1, № 2. С.74–79.
14. Акименко Л.І., Гордієнко О.І., Тиндик В.С. Біотехнологія конструювання, виробництва та контролю якості ветеринарних

препаратів та лікарських засобів. Ветеринарна біотехнологія №32(1), 2018. С.34-43.

15. Шемедюк Н. П. Клітинна інженерія: навч. посіб. Львів, 2018. 130 с.

16. Буцяк А.А., Буцяк В.І., Калин Б.М. Отримання та використання вермікомпосту (біогумусу) з метою покращення поживного режиму ґрунту. Екологічні науки, 2022. № 5(44). С. 116-120. DOI <https://doi.org/10.32846/2306-9716/2022.eco.5-44.16>.

17. Рибальченко Т.В., Кузнєцова Г.М., Держинський М.Е., Механізми клітинної диференціації. Київ: ВПЦ "Київський університет", 2017. 383 с.

18. Стівбурові клітини у ветеринарній медицині. Том II. Експериментальні дослідження з отримання, зберігання і застосування стівбурових клітин. Монографія /Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Харкевич Ю.О. Вид. ТОВ ЦП «Компринт». 2017. 280 с.

19. [dspace.mnau.edu.ua > bitstream > Osnovy_biotekhnolohiyi_tvaryn](https://dspace.mnau.edu.ua/bitstream/Osnovy_biotekhnolohiyi_tvaryn)

20. [socrates.vsau.org > html > cards > getfile.php](https://socrates.vsau.org/html/cards/getfile.php)

21. [repo.btu.kharkov.ua > materialy-MNPK_SIAHV_2021-455-457](https://repo.btu.kharkov.ua/materialy-MNPK_SIAHV_2021-455-457)

22. ocrates.vsau.org/b04213/literat/view/getfile/667395001293174113.pdf

23. rgt.org.ua/index.php?option=com_content&view=article...

Перелік тем рефератів

1. Предмет і завдання біотехнології. Основні принципи біотехнологічних виробництв. Проблеми і перспективи розвитку біотехнології.
2. Промислова мікробіологія. Промисловий біосинтез білка.
3. Біохімічні основи та технологія мікробіологічного виробництва амінокислот. Виробництво глютамінової кислоти, лізину і триптофану.
4. Принципи одержання та технологія виробництва вітамінів і антибіотиків.
5. Основи біотехнології гормонів і ферментів.
6. Хімічні основи і біотехнологія виробництва етанолу.
7. Біотехнологія виробництва біогазу.
8. Методи біотехнологічної переробки відходів виробництва. Мікробна деградація і конверсія.
9. Біотехнологія одержання інсуліну та соматотропіну генно-інженерними методами.
10. Природні модифікації геному та їх використання в біотехнології. Методи рекомбінації ДНК *in vitro* та їх використання.
11. Модифікація геному методом злиття соматичних клітин. Гібридоми.
12. Напрямки застосування методу культури тканин рослинних об'єктів. Сомаклональна варіабельність у культурі рослинних тканин і органів.
13. Суть і завдання методу культури тканин (суспензійні культури, калусні культури, культура ізольованих коренів і клітин, культура протопластів). Меристеми.
14. Принципи і техніка клонування. Переваги і недоліки клонів. Відмінності від інших методів розмноження.
15. Біосинтез метаболітів у культурі *in vitro*.
16. Біотехнологічні основи трансплантації ембріонів.
17. Біотехнологічні основи одержання трансгенних тварин.
18. Генетичні вектори і фактори переносу генетичної інформації (плазмідні і транспозини, фагові вектори, косміди і нуклеокапсидні фаги).
19. Загальна характеристика ферментів-рестриктаз та їх використання, генетичне картування, ДНК- і РНК-полімерази.
20. Реконструкція клітин, пересадка ядер із соматичних клітин в енуклійовані яйцеклітини, одержання гомозиготних гаплоїдних нащадків.

ЗМІСТ

Правила роботи і техніка безпеки при проведенні лабораторних занять.	4
Тема 1. Культури рослинних і тваринних клітин.	5
Лабораторне заняття №1. Приготування поживних середовищ для культивування рослинних клітин	5
Лабораторне заняття №2. Отримання рослинних суспензійних культур.	11
Лабораторне заняття №3. Мікроклональне розмноження.	14
Лабораторне заняття №4. Культивування тваринних тканин.	17
Тема 2. Одержання гонадотропіну та трансплантація ембріонів.	23
Лабораторне заняття №5. Одержання гонадотропіну із сироватки жеребної кобили.	23
Лабораторне заняття №6. Одержання і трансплантація ембріонів.	25
Тема 3. Молекулярно-біологічні основи одержання монозиготних і химерних тварин.	31
Лабораторне заняття №7. Одержання монозиготних близнят та химерних тварин методами біотехнології.	33
Тема 4. Імобілізація глюкоамілази і вивчення активності іммобілізованого і вільного ферменту.	38
Лабораторне заняття №8. Визначення активності вільного та іммобілізованого на цеоліті ферменту глюкоамілази	38
Тема 5. Біотехнологія одержання гіалуронідази.	44
Лабораторне заняття №9. Виділення лідази.	44
Тема 6. Біоконверсія відходів сільськогосподарського виробництва та біотехнологія одержання біогазу.	48
Лабораторне заняття №10. Розрахунки основних параметрів біотехнологічного процесу переробки гнойової маси в біогаз	48
Лабораторна робота №11. Методики розрахунків параметрів проектування потужності вермігосподарств на базі сільськогосподарських підприємств.	61
Лабораторна робота №12. Біоконверсія відходів сільськогосподарського виробництва у біопаливо	70
Рекомендована література	79
Перелік питань для рефератів	81