

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ  
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА**

**Ю. Г. Приседський, Л. О. Мікуліч**

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ  
ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ  
З БІОТЕХНОЛОГІЇ КУРСУ  
«МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ  
І БІОТЕХНОЛОГІЯ»**



**Вінниця 2023**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

**Ю. Г. Приседський, Л. О. Мікуліч**

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ  
ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ  
З БІОТЕХНОЛОГІЇ КУРСУ  
«МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ  
І БІОТЕХНОЛОГІЯ»**

**ВІННИЦЯ – 2023**

УДК 577:57.08

П77

*Затверджено на засіданні вченої ради факультету хімії, біології  
і біотехнологій ДонНУ імені Василя Стуса  
(протокол № 11 від 23 червня 2023 р.)*

**Рецензенти:**

КАБАР А. М., канд. біол. наук, доцент, директор ботанічного саду Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара;

БОЙКО С. М., канд. біол. наук, доцент, завідувач кафедри екології, старший науковий співробітник ДУ «Інститут еволюційної екології НАН України».

**П77** Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з біотехнології курсу «Молекулярна біологія і біотехнологія» / укладачі Ю. Г. Приседський, Л. О. Мікуліч. Вінниця, 2023. 76 с., з ілюстр.

Охарактеризовані методи організації та облаштування біотехнологічних лабораторій, сучасні вимоги до проведення експериментів та виробництва біотехнологічної продукції. У методичних вказівках наводяться склад, методи приготування та стерилізації живильних середовищ, методи посіву й вирощування мікроорганізмів та грибів як об'єктів біотехнології. Містяться методи культивування рослинних клітин та використання біотехнологічних прийомів утилізації відходів.

Методичні вказівки можуть бути використані викладачами та здобувачами вищої освіти спеціальності «Біологія та біохімія». Роботи з утилізації відходів можуть також використовуватися для підготовки фахівців зі спеціальності «Екологія».

**УДК 577:57.08**

© Приседський Ю. Г., 2023

© Мікуліч Л. О., 2023

© ДонНУ імені Василя Стуса, 2023

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
Лабораторна робота 1. Біотехнологічні лабораторії. Облаштування та обладнання.....	6
Лабораторна робота 2. Вивчення нормативних матеріалів з контролю якості. Системи GLP та GMP .....	15
Лабораторна робота 3. Тверді поживні середовища для культивування бактерій та грибів .....	18
Лабораторна робота 4. Живильні середовища для глибинного культивування. Склад рідких живильних середовищ.....	22
Лабораторна робота 5. Приготування маточних розчинів для середовища Мурасиге і Скуга.....	26
Лабораторна робота 6. Приготування середовища Мурасиге і Скуга.....	29
Лабораторна робота 7. Методи стерилізації посуду, інструментів і допоміжних матеріалів.....	31
Лабораторна робота 8. Методи стерилізації живильних середовищ. Пастеризація, стерилізація.....	33
Лабораторна робота 9. Чисті культури мікроорганізмів. Отримання чистих культур на прикладі грибів.....	38
Лабораторна робота 10. Колекції чистих культур. Методи виділення та підтримки .....	44
Лабораторна робота 11. Методи інокуляції. Отримання культур грибів .....	47
Лабораторна робота 12. Визначення молокозсідальної (сичужної) активності ...	51
Лабораторна робота 13. Мікроклональне розмноження рослин живцями .....	53
Лабораторна робота 14. Отримання первинного калюсу.....	55
Лабораторна робота 15. Отримання первинної калюсної культури .....	57
Лабораторна робота 16. Вплив співвідношення ауксин–цитокінін на ріст калюсної тканини та її тип .....	58
Лабораторна робота 17. Отримання клітинної суспензії .....	61
Лабораторна робота 18. Ознайомлення з промисловими біотехнологічними виробництвами.....	63
Лабораторна робота 19. Технологія виробництва біогазу .....	67
Лабораторна робота 20. Меристемна культура декоративних рослин у середовищі МС.....	71
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ .....	73

## ВСТУП

Біотехнологія – це наука про використання хіміко-біологічних процесів і біологічних об'єктів (мікроорганізмів, культур клітин і тканин рослинного і тваринного походження, ферментних препаратів та інших біологічно активних речовин) у промисловому виробництві. Назва її походить від грецьких слів *bios* – життя, *teken* – мистецтво, *logos* – наука. Відповідно до визначення Європейської федерації біотехнологів (ЄФБ, 1984) біотехнологія базується на інтегральному використанні біохімії, мікробіології, молекулярної біології, клітинної та генетичної інженерії з метою промислової реалізації властивостей мікроорганізмів, культур клітин і тканин. Уже у самому визначенні предмета відображено його місцезорозташування як прикордонного, завдяки чому результати фундаментальних досліджень у сфері біологічних, хімічних і технічних дисциплін набувають прикладного значення.

Біотехнологія – одна з найдавніших і водночас одна з наймолодших наук і галузей промисловості. Людство здавна опанувало на практиці різні процеси біотехнології. Ще з біблейських часів було відоме виноробство, випікання хліба, а дещо пізніше – одержання кисломолочних продуктів, квашеної капусти, медових алкогольних напоїв, силосування кормів тощо. Стародавні народи інтуїтивно використовували прийоми і способи виготовлення продуктів, які сьогодні ми відносимо до біотехнологічних. Однак термін «біотехнологія» прижився лише з середини 70-х років ХХ ст., коли біотехнологія пережила своє друге народження завдяки появі генетичної інженерії. Власне становлення біотехнології як самостійної науки розпочалося з 1972 р., коли П. Берг зі співробітниками у США створили першу рекомбінантну молекулу ДНК.

Звичайно, без фундаментальної роботи Ф. Кріка і Дж. Уотсона (1953) щодо встановлення структури ДНК було б неможливо досягнути сучасних результатів у сфері біотехнології. З'ясування механізмів функціонування і регуляції ДНК, виділення і вивчення специфічних ферментів привело до формування чіткого наукового підходу, до розробки біотехнологічних процесів на основі генно-інженерних робіт. Створення технологій рекомбінантних ДНК привело до того, що в 1982 р. надійшов у продаж людський інсулін, синтезований кишковими паличками, які містили штучно вмонтовану інформацію про цей гормон. Згодом з'явилися інші генно-інженерні препарати: інтерферони, соматотропний гормон людини, інтерлейкін-2 та інші. У цей період були одержані суперпродуценти антибіотиків, ферментів, амінокислот, вітамінів; розроблені та впроваджені екологічно чисті безвідходні технології; розроблена і впроваджена у практику спеціальна апаратура; здійснена автоматизація і комп'ютеризація біотехнологічних процесів тощо. Протягом останніх 10–15 років минулого століття проходив бурхливий розвиток біотехнології, визначалися сфери пріоритетного впровадження конкретних результатів технологічних розробок.

Великого значення на сучасному етапі біотехнологічні прийоми набувають і у галузі охорони довкілля та знешкодження виробничих відходів. Значного поширення набувають способи очистки побутових та промислових відходів за

допомогою культу мікроорганізмів. Це одна з найдавніших методик біотехнологічного очищення середовища. Іншими прикладами використання біотехнологічних методів є вермікультура та розкладання агропромислових відходів за допомогою метанобактерій з отриманням біогазу. Цей процес веде до вирішення одразу двох проблем. З одного боку, це утилізація відходів, а з іншого, – часткова заміна невідновного джерела енергії.

Враховуючи значення біотехнології у сучасному житті, слід зазначити, що сучасні фахівці у галузі біології, біохімії та екології повинні знати основи біотехнології, методи дослідження та культивування біотехнологічних об'єктів. Тому запропонований збірник методик включає в себе опис організації та облаштування біотехнологічних лабораторій, методи стерилізації, приготування живильних середовищ і способи культивування мікроорганізмів, грибів, рослинних клітин та тканин.

## Лабораторна робота 1. Біотехнологічні лабораторії. Облаштування та обладнання

**Мета роботи:** вивчити методичні основи організації робіт у біотехнологічній лабораторії.

Для організації біотехнологічної лабораторії необхідні просторі ізольовані приміщення, сучасне обладнання та високоякісні реактиви.

**1.1. Особливості оснащення лабораторії.** Для проведення біотехнологічних досліджень необхідно мати спеціалізовану лабораторію, яка укомплектована спеціальними приміщеннями і обладнанням. Відповідно до встановлених норм біотехнологічна лабораторія повинна мати такі приміщення:

1) кімната для миття посуду з холодною та гарячою водою, дистильатором, бідистильатором, сушильними шафами для посуду з режимом роботи 150–170 °С; шафами для зберігання чистого посуду й інструментів;

2) кімната для приготування поживних середовищ, оснащена технічними, аналітичними, торсійними і демпферними вагами, рН-метром, холодильником, електронагрівачами, водяною банею, лабораторними столами, центрифугою, витяжною шафою, термостатами з заданими режимами роботи (температурою, вологістю), гойдальними пристроями ролерного чи шейкерного типу, шафами для зберігання чистого посуду, реактивів, живильного середовища;

3) приміщення для стерилізації середовищ, інструментів, посуду, в якому обов'язково повинна бути вентиляція;



Рис. 1 – Стерильне приміщення

4) стерильне приміщення (асептичне) для введення органів, частин або тканин рослин в асептичні умови *in vitro*, кімната, забезпечена ламінар-боксами. Ця кімната повинна мати підлогу з кахлю чи лінолеуму для запобігання пошкодження та руйнування внаслідок регулярного миття дезінфікуючими розчинами (хлораміну, хлорного вапна, іншими засобами промислового виробництва). Стерилізують бокс за допомогою бактерицидних ламп типу

ОБП-300, БУФ-15, БУФ-30 або альтернативних іноземних марок;

5) світлова культуральна кімната з термостатованими умовами (строго регульованою температурою, у більшості випадків 25–27 °С; відносною вологістю повітря 70–80 %; встановленою тривалістю світлового дня), де на спеціальних стелажках і полицях розміщують ізольовані культури. З метою кондиціонування повітря використовують різної потужності промислові кондиціонери залежно від об'єму приміщення;



– Світлова культуральна кімната

б) темнова культуральна кімната з кондиційованим повітрям, температурою 25–26 °С, відотною вологістю 70–80 %, оснащена установками ротаційного та шейкерного типу і використовується для вирощування калюсних культур та клітинних суспензій.

## 1.2. Обладнання біотехнологічних лабораторій

**1.2.1. Ламінарні бокси.** Ламінарний бокс – лабораторне устаткування, шафа для роботи з хімічними або біологічними об'єктами в стерильних умовах, призначена для запобігання забрудненню хімічних чи фізичних об'єктів, біологічних зразків або будь-яких інших матеріалів, чутливих до мікрочастинок. Являє собою шафу, що складається із робочого стола та захисного покривного каркаса, обладнану освітлювачами, ультрафіолетовими лампами і системою подачі всередину

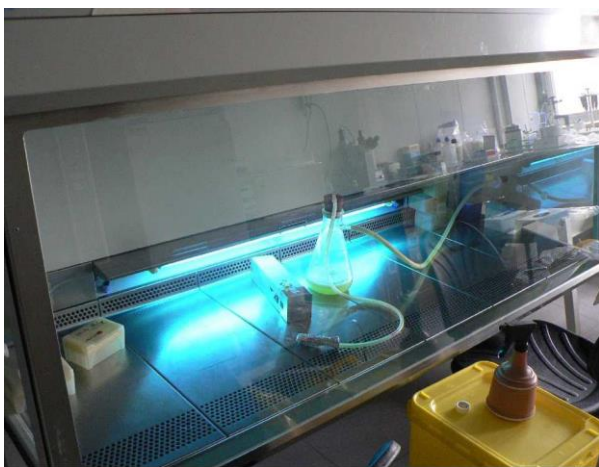


Рис. 3 – Ламінарний бокс із включеним УФ-опроміненням

чистого, стерильного повітря. Використовується під час мікробіологічних, молекулярно-біологічних робіт, робіт із культурою клітин, тканин і органів, напівпровідниковими пластинами. Повітря втягується через фільтр HEPA і подається в бокс ламінарним потоком (рівномірний рух повітря без завихрень). Завдяки напрямку повітряного потоку зразок захищений від користувача, але користувач не захищений від зразка. Шафа (бокс) зазвичай виготовляється з нержавіючої сталі, без проміжків або стиків, де можуть збиратися спори та тверді мікрочастинки.

Такі шафи існують і в горизонтальній, і у вертикальній конфігураціях, і існує багато різних типів шаф із різноманітними схемами повітряного потоку. Бактерицидні лампи зазвичай працюють протягом 15 хвилин для стерилізації внутрішніх поверхонь бокса. Водночас не слід контактувати з ламінарною витяжкою. За цей час вчені зазвичай готують інші матеріали для досягнення максимальної ефективності. Важливо вимкнути це світло під час використання боксу, щоб обмежити опромінення шкіри та очей, оскільки експозиція ультрафіолетового світла на очі може спричинити рак та катаракту.

### **Мікробіологічна безпека**

Під час використання ламінарного боксу не можна домогтися повного захисту оператора, тому існує небезпека його зараження. Для цього були створені вдосконалені прилади – бокси мікробіологічної безпеки. Існує 3 класи цих боксів, що відповідають 3 класам захисту:



Рис. 4 – Ламінарний бокс із горизонтальним потоком повітря

*I клас захисту – бокс не герметичний, повітря забирається ззовні, і проходить через НЕРА-фільтр, викидається назовні. У цьому випадку завданнями боксу є: забезпечення безпеки оператора, очищення відпрацьованого повітря. На жаль, під час використання апаратів цього класу захисту може статися випадкове зараження чистих культур об'єктами, які потрапили в бокс із зовнішнім повітрям.*

*II клас захисту – бокс також не герметичний, проте в цих апаратах використовується більш вдосконалена система повітрообміну. Вона полягає в тому, що зовнішнє повітря проходить через фільтр і потрапляє в робочу камеру боксу, а потім, очищаючись від забруднень фільтрами, потрапляє назовні. Незважаючи на те, що йде невеликий забір повітря ззовні без очищення, ця система ефективніша і в частині захисту оператора, і у збереженні чистоти культур клітин, мікроорганізмів та ін.*

*III клас захисту – найбільш вдосконалений за ступенем захищеності бокс, оскільки його робоча камера є повністю герметичною. У ній постійно підтримуються певні умови середовища, як-от стерильність і децю негативний тиск. Саме в таких приладах проробляються маніпуляції з мікроорганізмами 1–2 груп патогенності.*

**1.2.2. Біореактори.** Біореактор (ферментатор) – апарат для культивування мікроорганізмів, рослинних і тваринних клітин, у якому відбуваються біохімічні реакції. Біореактори виготовляються зі скла (лабораторні) та нержавіючої сталі (пілотні та промислові). Їх можна підрозділити на:

- *біореактори для культивування бактерій та грибів;*
- *біореактори для культивування клітин і тканин рослин;*
- *біореактори для культивування клітин і тканин тварин.*

Біореактори – це герметичні циліндричні ємності об'ємом 0,05–200 м<sup>3</sup>. Розміри ферментаторів визначаються співвідношенням зовнішнього діаметра до висоти, яке варіює зазвичай у межах від 1 : 2 до 1 : 6. У біореактори встановлюють мішалки турбінного, пропелерного або іншого типів. Для підтримки температури в біореакторах є подвійний кожух або теплообмінник за типом зміювика. До того ж біореактор має трубопроводи для підводу поживного середовища, води, пари, повітря, піногасників та інших речовин. Для контролю та регулювання процесів біосинтезу ці прилади обладнані вимірювальними та регулюючими пристроями: вимірювання температури, рН, обертів мішалки, рівня піни, концентрації біомаси тощо. Біореактори використовують для проведення анаеробних та аеробних процесів ферментації. Під час аерації та перемішування поживного середовища у процесі ферментації утворюється піна, яка може порушити стерильність процесу та викликати втрату культуральної рідини. Через це робочий об'єм біореактора не має перевищувати 7/10 загального об'єму. Для піногасіння використовують як хімічні речовини, так і механічні методи.

Розрізняють установки для поверхневого та глибинного культивування. Для поверхневого культивування мікроорганізмів на твердих поживних середовищах використовують ростильні установки різних конструкцій. Апарати періодичної дії зазвичай мають вигляд горизонтальних барабанів, а апарати безперервної дії – колон, розділених на певну кількість секцій залежно від потужності виробництва та технології культивування. Установки для глибинного культивування, зі свого

боку, підрозділяють на 3 групи: 1) з підводом енергії до газової фази; 2) до рідкої фази; 3) до газової та рідкої фаз. Біореактори зазначених груп мають велику кількість загальних елементів. Різниця полягає в конструкціях перемішувальних пристроїв і таких, через які здійснюється аерація. До ферментаторів 1-ї групи належать барботажні, барботажно-ерліфтні, колонні та ін. Серед апаратів 2-ї групи можна виділити три основні групи: ферментатори із самовсмоктуючими мішалками, струменеві та ежекційні. У біореакторах 3-ї групи енергія підводиться до рідкої фази за допомогою перемішувального пристрою, а до газової фази – шляхом примусової подачі повітря.



Рис. 5 – Лабораторний біореактор

здійснюють термічним шляхом: «гострою» парою або парою, яка регенерується у самому біореакторі за допомогою електронагрівачів. У деяких випадках використовують попередню обробку біореакторів хімічними речовинами.

**1.2.3. Лабораторні термостати.** Лабораторний термостат – це спеціальна універсальна регульовальна техніка для дискретного управління процесами нагрівання та охолодження. Застосовується в різних лабораторних дослідженнях, у яких важлива стабільна підтримка температури протягом певного часу. Без неї часто не обходяться під час бактеріологічного аналізу, у клініко-діагностичних відділеннях поліклінік, науково-дослідних і медінститутах, стоматологічних кабінетах, ветеринарних лабораторіях, станціях переливання крові, водоканалах, харчових та іншої спрямованості виробничих підприємствах тощо. З її допомогою створюються оптимальні умови для виконання тих чи інших реакцій. Не є винятком її застосування з метою зберігання лабораторних зразків, які за звичайних умов швидко псуються. Для цього використовують нижню температурну межу – трохи вище нуля.

**Види лабораторних термостатів.** В основі головної класифікації цих пристроїв лежать функціональність і конструкція (тип нагрівального елемента).

К. Шюгерль (1982) запропонував підрозділяти біореактори на 3 основні групи за способом споживання енергії для перемішування та диспергування стерильного повітря:

- 1) енергія використовується на механічний рух внутрішніх елементів;
- 2) енергія використовується на роботу зовнішнього насоса, який забезпечує рециркуляцію рідини і / або газу;
- 3) енергія використовується на стискування та подачу газу в культуральну рідину.

Однією з головних вимог до біореакторів є збереження стерильності під час процесу культивування, тому вони повинні бути герметичними. Стерилізацію біореакторів та системи трубопроводів

Відповідно існує поділ на такі прилади:

- *сухоповітряні (теплоносієм слугує повітря).*

*Діють за принципом сушильних шаф, хоча і мають низку суттєвих відмінностей у плані функціоналу. Основні споживачі – лікарні та клініки, а також санітарні та бактеріологічні лабораторії. Цей вид техніки, зі свого боку, ділиться на заглибні (поміщаються в рідке середовище, температуру якого необхідно підтримувати) і циркуляційні (передбачають розміщення матеріалу в корпусі) установки. Останні найбільш популярні, всередині їх камер постійно циркулює повітря, що забезпечує високу точність процесу;*



Рис. 6 – Термостат сухоповітряний



Рис. 7 – Термостат водний

- *рідинні, тобто ті, що мають водний наповнювач. Призначені підтримувати надточну температуру, використовуються під час коагуляції, досліджень мікробіологічного, вірусологічного та біохімічного характеру. Конструкція таких установок складна. Певна температура підтримується за допомогою теплоносія – води (найкраще дистильованої) або синтетичної олії (якщо дослідження вимагають температури вищої, ніж допустима межа);*

- *кріотермостати – функціонують із застосуванням сучасних холодоагентів. Підтримують мінусові температурні показники.*

Всім перерахованим видам характерна наявність робочої ємності, виконаної з високоякісного матеріалу (зазвичай це нержавіюча сталь) та ізольованої від зовнішніх факторів впливу. Контроль робочого процесу здійснюється за допомогою спеціальних датчиків та індикації. Завдяки їм оператор завжди в курсі, яка температура всередині. Більшість моделей комплектується сигналізацією, що оповіщає про несправності. Отже, негаразди, які виникають під час роботи, можна вирішувати швидко, а головне – своєчасно, зберігаючи цілісність вмісту камери. Примітна риса сучасних моделей – збереження потрібних температурних параметрів протягом довгого періоду. Це дуже важливо, наприклад, для бактеріологічних експериментів або пророщування насіння.

**Принцип роботи.** Лабораторні термостати функціонують за принципом охолодження повітря внутрішнього простору із застосуванням холодильного компресора. Якщо говорити про сухоповітряні моделі, то вони характеризуються примусовим змішуванням повітря, завдяки чому температура всередині камери розподіляється рівномірно. Діапазон робочих температур сухоповітряних пристроїв – 3–70 °С (залежно від моделі). Ту чи іншу температуру із зазначеного



Рис. 8 – Кріотермостати

діапазону автоматично підтримує мікропроцесорна система. Зовнішня температура (тобто  $t$  повітря в приміщенні, в якому перебуває термостат) не здійснює жодного впливу. Водяні термостати зазвичай працюють з температурою 25–80 °С. Управління ними відбувається за допомогою спеціальних високоточних електронних блоків. Переваги сучасних термостатів:

- широта застосування та багатофункціональність;
- наявність таймера, що дає змогу задавати часові межі, і звуко-візуального індикатора, який повідомляє про закінчення процесу;
- відсутність впливу навколишнього середовища на робочу температуру;
- захист від перегрівання;
- незначна вага, компактні розміри і ергономічність;
- простота експлуатації та нескладний догляд.

Все це перетворює термостат не просто на функціональне, а на корисне й вигідне обладнання для будь-якої лабораторії.

**1.2.4. Лабораторні центрифуги.** Центрифуга – машина для розділення гідросумішей (пульп, суспензій) на тверду та рідку фази під дією відцентрової сили. Призначена для отримання зневодненого продукту (осаду) та рідкої фази (фугату).



Рис. 9 – Лабораторна центрифуга настільна



Рис. 10 – Лабораторна центрифуга рефрежераторна

**Загальний опис.** Центрифуги застосовуються в лабораторній практиці, в сільському господарстві для очищення зерна, видавлювання меду зі стільників, виділення жиру з молока, у промисловості для збагачення руд тощо. Високошвидкісні газові центрифуги застосовуються для розділення ізотопів, насамперед ізотопів урану в газоподібному з'єднанні (гексафториду урану UF<sub>6</sub>).

**1.2.5. Лабораторна ультрацентрифуга.** Ультрацентрифуга (англ. *ultracentrifuge*) – прилад для розділення часток розміром менше 100 нм (колоїдів,

субклітинних часток, макромолекул білків нуклеїнових кислот, ліпідів, полісахаридів, синтетичних полімерів та ін.) зважених або розчинених у рідині. Це досягається обертанням ротора, що створює відцентрове поле з прискоренням, що на багато порядків перевищує прискорення сили тяжіння.

**Опис.** За призначенням і конструкцією ультрацентрифуги підрозділяються на препаративні, аналітичні і препаративно-аналітичні. Препаративні ультрацентрифуги забезпечені кутовими роторами з гніздами для циліндричних пробірок, стаканів або пляшок, нахилених під кутом 20–40° до вертикальної осі ротора, або так званими бакетними роторами зі стаканами, що повертаються під час обертання на 90°. Існують також зональні і проточні ротори з однією великою внутрішньою порожниною для рідини, що фракціонується. Препаративні ультрацентрифуги застосовуються для виділення зі складних середовищ окремих компонентів, наприклад, субклітинних органел і вірусів.

Аналітичні ультрацентрифуги забезпечені роторами з наскрізними циліндричними гніздами, в які поміщені спеціальні прозорі кювети для досліджуваних розчинів або суспензій. Процес перерозподілу часток у них можна спостерігати безпосередньо під час обертання ротора за допомогою спеціальних оптичних систем (рефрактометричних, абсорбції).

Випускається багато видів ультрацентрифуг, у яких створюються відцентрові прискорення аж до 1 000 000 g, а розділення частинок і молекул здійснюється в обсягах, вимірюваних десятками і сотнями мілілітрів. Сьогодні ультрацентрифугування активно використовується для визначення молекулярно-масового розподілу макромолекул у розчині.



Рис. 11 – Аналітична ультрацентрифуга



Рис. 12 – Препаративна ультрацентрифуга

**1.2.6. Ампліфікатор для ПЛР.** Ампліфікатор (термоциклер, ПЛР-машина) – це пристрій, що забезпечує періодичне охолодження і нагрів пробірок, зазвичай з точністю не менше 0,1 °С. Ампліфікатор використовується в молекулярній біології для ампліфікації ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції. Сучасні ампліфікатори дають змогу задати потрібну кількість циклів і підібрати оптимальні параметри часу та температури для кожної процедури циклу.

**Основний принцип.** Ампліфікатор ДНК (термоциклер) – це програмований терморегулятор із можливістю циклічного повторення програми. Найважливішими характеристиками ампліфікатора є швидкість лінійної зміни і точність підтримки температури: що вони вищі, то вищі швидкість і якість ПЛР. Кращі сучасні моделі

забезпечують швидкість нагрівання / охолодження до 8 °С/сек і точність температури 0,1 °С відповідно.

Основними елементами ампліфікатора ДНК є термоблок і системи терморегулювання та управління.

**Термоблок.** Термоблок використовується для фіксації реакційних посудин і забезпечення передачі тепла. Зазвичай пробірки використовуються в тому чи іншому варіанті. На практиці найчастіше використовуються одноразові пластикові пробірки об'ємом 0,2 мл у вигляді індивідуальних пробірок, смужок з 8 пробірок і 96-лункових пластин. Використовуються два види термоблоків – твердотільні і поворотні. Твердотільний – це блок сплаву з високою теплопровідністю з виїмками для реакційних посудин. Роторний – тільки фіксує пробірки і має повітряний терморегулятор. Обидва види мають свої переваги і недоліки, але більшого поширення набули пристрої з твердотільним термоблоком. Основними вимогами до термоблока є висока теплопровідність і рівномірність температури, що досягає 0,1 °С в кращих моделях.



Рис. 13 – Ампліфікатор

У сучасних моделях кришка термоблока оснащена нагрівачем («гаряча кришка», Hotlid) для запобігання випаровуванню реакційної суміші. Кришка має механічний затиск для забезпечення щільного контакту реакційних судин з термоблоком і «гарячою кришкою», яка часто регулюється для використання витратними матеріалами різної висоти. Управління регульованим затискачем буває ручним або автоматизованим електромеханічним. Існує два основні варіанти кришки термоблока – навісний і висувний термоблок (нагадує лоток CD-приводу) з кришкою, розміщеною всередині пристрою. У застарілих моделях ампліфікаторів без «гарячої кришки» для запобігання випаровуванню реакційної суміші поверх реакційної суміші необхідно наносити мінеральне масло.

**Система терморегулювання.** Терморегулювання в сучасних ампліфікаторах здійснюється за допомогою елементів Пельтьє з радіатором і вентилятором, що забезпечує найбільшу швидкість зміни температури і меншу залежність від кімнатної температури, також надійність і компактність за рахунок спрощення конструкції. Термоблок з елементами Peltier і радіатором розташований у єдиному блоці, вентилятор найчастіше знаходиться окремо на шасі пристрою і під час цього охолоджує електронні компоненти пристрою. Часто є можливість зміни фіюзера користувачем.

Раніше використовувалися такі конструктивні рішення:

- *Набір твердотільних термоблоків або водяних ванночок з фіксованою температурою для кожної температурної «полиці». Перехід між температурними «полицями» здійснювався за допомогою перенесення реакційних посудин механічним маніпулятором. Підвищена складність, великі габарити.*

• *Резистивний нагрів і повітряне охолодження, примусове або пасивне. Низька швидкість охолодження, неможливість охолодження нижче кімнатної температури. Під час пасивного охолодження повна безшумність.*

• *Резистивний нагрів і охолодження проточною водою або холодильною установкою. Підвищена складність, громіздкість, неможливість зміни термоблока. Використання холодильної установки забезпечує меншу залежність від кімнатної температури.*

**Система управління.** Система управління базується на вбудованому мікрокомп'ютері і контролює температурний режим за програмою посилення. Контроль температурного режиму здійснюється на основі показань термодатчиків у термоблоку і математичної моделі, що дає змогу точно досягти заданої температури, швидко її стабілізувати і забезпечити рівномірність температурного режиму на термоблоку. Користувальницький інтерфейс інструменту складається з буквено-цифрового або графічного дисплея і клавіатури. Під час запуску програми ампліфікації дисплей показує назву програми, поточний крок, встановлену та фактичну температуру реакційної суміші. Якщо використовувати графічний дисплей, то кроки програми відображаються більш наочно у вигляді діаграми. Сучасні ампліфікатори високого класу оснащені кольоровими сенсорними екранами з високою роздільною здатністю з інтерфейсами, схожими з інтерфейсами мобільних пристроїв, і низькою сервісних функцій. Зазвичай можна підключитися до зовнішнього комп'ютера для управління ампліфікатором з нього і реєстрації операцій. Ампліфікатори початкового рівня можуть не мати вбудованого інтерфейсу користувача, і ними можна керувати тільки з зовнішнього комп'ютера. Також часто є можливість підключення принтера до протоколів друку робіт відповідно до вимог GLP. Багато сучасних пристроїв мають можливість використовувати USB-накопичувачі для розширення внутрішньої пам'яті і обміну програмами ампліфікації. У блоці живлення рекомендується використовувати джерело безперебійного живлення.

### **Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Дайте визначення біотехнології як галузі науки та виробництва. Наведіть галузі біотехнології.

2. Які вимоги висуваються до біотехнологічних лабораторій?

3. Охарактеризуйте облаштування біотехнологічних лабораторій. Які відділення повинна мати лабораторія та яке їх призначення?

4. Наведіть загальну характеристику обладнання, необхідного для роботи біотехнологічної лабораторії.

5. Яке призначення ламінарних боксів? Їх класифікація та принципи дії.

6. Охарактеризуйте роботу з біореакторами. Наведіть їх класифікацію.

7. Для чого в лабораторіях використовуються термостати? Наведіть їх класифікацію та принцип дії.

8. За допомогою яких приладів можна розділити речовини, що складаються з рідкої та твердої фаз? Як вони працюють?

9. Охарактеризуйте призначення та принципи роботи ампліфікаторів та терморекциклерів. Чим відрізняються ці прилади?

## Лабораторна робота 2. Вивчення нормативних матеріалів з контролю якості. Системи GLP та GMP

**Мета роботи:** ознайомити здобувачів вищої освіти з належними практиками досліджень та виробництва біотехнологічної продукції.

**1.1. Належна лабораторна практика (Good Laboratory Practice, GLP)** – система якості, пов'язана з організаційним процесом та умовами, за яких доклінічні дослідження безпечності для здоров'я людини та довкілля плануються, виконуються, контролюються, документуються, оформляються у вигляді звіту та зберігаються в архіві.

Тобто **система GLP** – це зведення правил, які регламентують проведення стандартизації лікарських препаратів та інших біологічно активних речовин, а система GMP – їх виробництво.

Метою **GLP** є запобігання непотрібним повторенням тестів, використанню експериментальних тварин, втраті часу та ресурсів шляхом забезпечення того, щоб якість даних тестів для визначення впливу хімічних речовин та продуктів на здоров'я і навколишнє середовище була порівняною та прийнятною для різних країн. Це система, яка контролює якість обслуговування лабораторій і вимагає використання правильних методів у лабораторіях. Зокрема, лабораторії, які проводять випробування, необхідні для класифікації небезпечних хімічних речовин, повинні запровадити систему GLP і діяти відповідно до необхідних стандартів.

З метою організації якісного проведення доклінічних випробувань лікарських та інших біологічно активних речовин (харчових добавок, агрохімікатів тощо) у промислово розвинених країнах, як-от Англія, Німеччина, США, Франція, Японія, затверджені єдині правила системи GLP. Головним у цій системі є таке:

*1) завчасна розробка стандартної методики проведення випробувань або SOP (Standart Operating Procedure) стосовно усіх його етапів;*

*2) призначення керівника і відповідальних за кожен вид випробувань;*

*3) виконання відповідальним керівником усіх дій у відведених йому межах;*

*4) внесення результатів виконання у спеціальний протокол, який має бути датований і підписаний;*

*5) можливість за необхідності подвійної перевірки;*

*6) зберігання фактичних даних, записів і препаратів (речовин) у певному порядку для швидкого пошуку;*

*7) формування остаточного звіту за змістом, що відображає отримані дані, а також супроводжується обговоренням, складеним відповідальним виконавцем; на звіті проставляються дата і підписи (відповідального виконавця і осіб, які підтверджують зміст звіту);*

*8) наявність служби якісної оцінки випробувань – QAU (Quality Assurance Unit). Особи, задіяні у цій службі, зобов'язані проводити внутрішню інспекцію в установленому порядку і за необхідності видавати рекомендації щодо вдосконалення процесів проведення випробувань.*

Відповідно **GLP** через необхідність проведення випробувань створюють спеціальні групи:

- загальну (зокрема і для контролю за гігієною і санітарією працюючих);
- мікробіологічну для вивчення метаболізму;
- проведення загальнофармакологічних випробувань та загальних клінічних досліджень;
- патолого-анатомічну для проведення експериментів на тваринах,
- обробки даних (включно з управлінням ЕОМ), з підготовки проб, аналітичну, з управління дослідженням і, за необхідності, інші.

Додержання вимог системи GLP має бути підкріплено досконалістю організації усіх допоміжних служб і достатнім матеріальним забезпеченням.

У роботі з тваринами мають враховуватися усі інфекційні захворювання, які можуть вплинути на результати експериментів. Водночас необхідно враховувати той факт, що окремі збудники інфекційних захворювань можуть передаватися від людини до тварин і навпаки. До них належать віруси сказу, лімфоцитарного хоріоменінгіту, деякі бруцели, сальмонели, мікобактерії туберкульозу, дизентерійна амеба тощо.

Схвалений препарат (речовина) після лабораторних передклінічних випробувань за системою GLP і подальшої клінічної перевірки дозволяється до випуску в умовах промислового виробництва.

В Україні на законодавчому рівні прийнятий Наказ Міністерства охорони здоров'я «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» від 14.12.2009 № 944).

Для забезпечення виготовлення продукту високої якості Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) у 1968 р. затвердила «Вимоги до практики якісного виробництва при виготовленні і контролі якості ліків і до спеціалістів у сфері фармації». Роком пізніше ці вимоги, які ввійшли (з невеликими змінами і уточненнями) у правила системи GMP, були рекомендовані Асамблеєю ВООЗ для міжнародної торгівлі, а в 1971 р. вони були видані як додатки до другого видання Міжнародної Фармакопеї.

**1.2. GMP (Good Manufacturing Practice)** – це єдина система вимог з контролю якості лікарських засобів з початку переробки сировини до виробництва готових препаратів, включно з загальними вимогами до приміщень, обладнання і персоналу. З 1975 р. правила GMP розширені і стосуються різних хімічних і біологічних речовин, ветеринарних препаратів; вихідних матеріалів для використання в дозованих формах, якщо вони включені у законодавства країн-експортерів і країн-імпортерів; інформації про безпеку й ефективність перерахованих речовин, матеріалів, препаратів.

**GMP** – частина системи забезпечення якості, яка гарантує, що продукція виробляється і контролюється за стандартами якості, згідно з торговельною ліцензією, та відповідає їй призначенню. Правила GMP призначено для зниження ризику у використанні будь-якої фармацевтичної продукції, котрий неможливо повністю

усунути тестуванням готової продукції. Принципи та правила GMP є обов'язковими для всіх країн-членів ЄС. Настанови з GMP визначають мінімальні норми, яких повинні чітко дотримуватися виробники, оскільки кожен з елементів забезпечення якості ліків є однаково критичним для системи загалом.

В Україні Наказом МОЗ від 14 грудня 2001 р. № 506 була затверджена і введена в дію Настанова 42-01-2001 «Лікарські засоби». Цей документ відповідає зазначеному вище документу ЄС, у якому викладено організаційно-технічні вимоги до виробництва лікарських засобів. Він є обов'язковим до виконання у країнах ЄС.

За нормативами **GMP**:

- *доступ у виробничі приміщення можуть мати лише особи, які зайняті на виробництві;*
- *виготовлення немедичної продукції у зонах і на обладнанні, призначеному для виготовлення фармацевтичної продукції, забороняється;*
- *дотримування правил техніки безпеки для попередження виникнення, накопичення і розповсюдження пилу, що може призвести до перехресного забруднення продуктів та матеріалів;*
- *мікроорганізми можуть потрапляти у повітря і на частинки пилу із інших матеріалів і продуктів при їх виготовленні, із забруднених обладнання і одягу, шкіри працюючих. Запобігти цьому можна шляхом виготовлення кожного цільового продукту в роздільних зонах (пеніциліни, живі вакцини й інші БАР) або, у крайньому випадку, виготовлення їх у часі порізно;*
- *забезпечення відповідними повітряними шлюзами; захисного технологічного одягу; використання; використання «закритих систем» виробництва тощо.*

Згідно із **GMP** для кожної партії продукту до випуску має бути лабораторна документація з підтвердженням відповідності кінцевого продукту специфікаціям. Із кожної партії цільового продукту залишають проби на зберігання терміном, який перевершує на рік строк придатності продукту. Проби мають зберігатись у такій кількості, щоб можна було за необхідності провести щонайменше два повторні дослідження.

Також GMP включає розділи про стерильні фармацевтичні продукти і практику якісного виробництва основної маси лікарських субстанцій.

### **Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Які принципи покладені у основу сучасних підходів до проведення наукових досліджень та випробувань біотехнологічної продукції?
2. Охарактеризуйте основні положення належної лабораторної практики (GLP).
3. Яких вимог потрібно дотримуватися під час виробництва біотехнологічної продукції (лікарські препарати, БАДи тощо)?
4. Наведіть основні положення належної практики біотехнологічного виробництва (GMP).
5. В яких країнах прийняті та виконуються вимоги GLP та GMP?

### Лабораторна робота 3.

#### Тверді поживні середовища для культивування бактерій та грибів

**Мета роботи:** надати здобувачам вищої освіти відомості про властивості та способи приготування твердих живильних середовищ для культивування мікроорганізмів та грибів.

**Загальні відомості.** Поживне середовище (живильне середовище) – субстанція, яку використовують для лабораторного (штучного) вирощування організмів. Сьогодні відомо безліч стандартних біологічних поживних середовищ. Основа багатьох середовищ, які використовують, зокрема, для культивування бактерій, бактеріофагів, личинок дрозодів тощо – агар-агар. За набором специфічних компонентів можуть бути виділені мінімальне середовище, селективне середовище тощо.

Для кожного виду біологічного матеріалу використовується певний набір складових живильних середовищ. Це пов'язано з тим, що в різних видах біологічного матеріалу знаходяться різні види мікроорганізмів і необхідно, щоб вирости максимально усі. Використовуються поживні **середовища загального призначення** – на них зростає переважна більшість мікроорганізмів (кров'яний агар, шоколадний агар); **диференціальні середовища** – дають змогу відрізнити різні види мікроорганізмів (середовище Ендо для ентеробактерій), **селективні середовища** – ростуть тільки окремі види організмів або клітин (ентерококагар для виявлення ентерококів, манітол-сольовий агар для виявлення стафілококів).

Живильні середовища за консистенцією бувають щільні та рідкі. За складом: **білкові, безбілкові та мінеральні (розчини)**. За походженням: **природні** – тваринного походження (молоко, яйця, жовч, кров, кров'яна сироватка) та рослинного походження (овочі, плоди, соки, зерно гороху тощо). Широке застосування знайшли **штучні середовища** тваринного походження (МПА, МПБ, МПЖ) та рослинного (настої і відвари сіна, соломи, дріжджів, пивне сусло). Будь-яке живильне середовище повинно відповідати таким вимогам:

1. Містити поживні речовини, необхідні для росту цього організму або клітин, у певних пропорціях.

2. Бути вологим, оскільки організми засвоюють речовини з розчинів (голозоїним шляхом).

3. Бути стерильним.

4. Бути прозорим – ця вимога тільки для тих середовищ, на яких вивчаються культуральні і біохімічні властивості (МПА, МПБ, МПЖ, вуглеводні середовища).

5. Повинно мати слабо лужну реакцію (рН 7,2–7,4), крім тих, які призначені для вирощування молочнокислих бактерій та грибів (рН 6,0–3,5).

Живильні середовища за своїм призначенням поділяють на **звичайні (прості), кольорові і спеціальні**. До простих належать молоко, картопля, МПБ, МПЖ, МПА. Кольорові – це середовища з індикаторами, які змінюють свій колір під час виділення продуктів життєдіяльності мікробів – кислот, ферментів. Спеціальні середовища готують для тих мікроорганізмів, які не ростуть на звичайних середовищах. Агар-агар – це речовина, яку отримують з морських водоростей. Складається з пектинових азотистих речовин і вуглеводів. Агар як поживну речовину більшість патогенних мікробів не використовують. Желатина – білкова речовина, яка отримується під час виварювання кісток, хрящів тварин. У гарячих

розчинах агар і желатина розбухають і перетворюються на драглисту масу. Для вирощування майже всіх збудників хвороб у заводських умовах виготовляють сухі живильні середовища. На етикетках вказано, скільки необхідно взяти порошку на літр дистильованої води. Приготовані середовища нагрівають до розчинення порошку, визначають рН, фільтрують і стерилізують. Кольорові живильні середовища (Гісса) використовують для визначення цукролітичних властивостей бактерій. Середовища для визначення ферментації вуглеводів: агар Ендо – бактерії, які розкладають лактозу, фарбують середовище в червоний колір, а негідролізуючі – утворюють безбарвні колонії. Середовище Левіна має фіолетовий колір; бактерії, що розщепляють лактозу, утворюють сині або чорні колонії, а що не розщепляють – безбарвні. Живильні середовища для вирощування анаеробів: Кітта-Тароцці, кров'яний цукровий агар, мозкове середовище. Середовища для вирощування грибів: Сабуро, агар Чапека. В дослідженнях часто використовуються такі живильні середовища.

**Універсальні для бактерій:**

- *середовище Левіна;*
- *середовище Ендо (Агар Ендо);*
- *середовище Плоскірєва (Бактоагар Плоскірєва);*
- *гліцеринові середовища (гліцериновий бульйон);*
- *картопляні середовища;*
- *ясні середовища (Левенштейна–Йєнсена; Ловенштейна–Йєнсена, Петрова, Петран'яні);*
- *напівсинтетичні та синтетичні середовища (середовище Сотона), середовище для виділення L-форм бактерій, середовище Прайса (цитратна кров);*
- *агар глюкозо-пептонний;*
- *агар поживний сухий;*
- *агар лужний сухий для холерних вібріонів;*
- *агар-агар;*
- *ацетатний агар;*
- *вісмут-сульфіт агар (ВСА);*
- *жовч суха;*
- *казеїново-вугільний агар (КУА);*
- *лактобакагар;*
- *малонат агар;*
- *основний пептон для холерних вібріонів;*
- *ОТДМ;*
- *пептон ферментативний;*
- *поживне середовище Пізу;*
- *поживний бульйон сухий;*
- *селенітове середовище;*
- *середовище Кітта–Тароцці.*

**Для культивування грибів:**

- *сусло-агар с додаванням вуглеводів;*
- *рисовий відвар;*
- *овочеві відвари;*

- середовище Сабуро;
- середовище Гіссен;
- середовище Кесслера;
- середовище Кліглера;
- середовище Коду;
- середовище Олькеницького;
- середовище Ресселя;
- середовище Сіммонса;
- тіогліколеве середовище;
- телур калію 2 % 10 амп. × 5 мл;
- екстракт кормових дріжджів;
- еритрит агар.

### **Склад та приготування деяких середовищ**

#### **1. Середовища для культивування мікроорганізмів**

**М'ясо-пептонний агар (МПА)** – найпоширеніше універсальне поживне середовище в мікробіологічних дослідженнях. Склад: ферментативний пептон, екстракт м'яса (1 : 2), натрію хлорид, глюкоза, агар.

Середовище являє собою щільне поживне середовище жовтого кольору. Для мікробіологічних цілей випускається у вигляді щільного поживного середовища по 300 мл у скляних флаконах, закупорених пробками та завальцьованих алюмінієвими ковпаками. Використовується для культивування та вивчення культуральних властивостей різних мікроорганізмів. Можливе використання препарату як поживної основи для приготування різних поживних середовищ цільового призначення.

Приготування: до 1 л м'ясо-пептонного бульйону додають 15–20 г дрібно нарізаного агар-агару. Середовище нагрівають до розчинення агару (температура плавлення його 100 °С, застигання – 40 °С), встановлюють слаболужну реакцію середовища 20 % розчином Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, і через лійки розливають у пробірки або чашки. Пробірки із середовищем стерилізують в автоклаві за 120 °С протягом 20 хв.

Існує також інший варіант середовища – м'ясо-пептонна желатина (МПЖ), де замість агару для затвердіння середовища використовують желатин. В 1 л м'ясо-пептонного бульйону додають 100–150 г желатини. Температура плавлення залежить від процентного вмісту в середовищі. 10 % желатина плавиться за 24 °С, 15 % – за 25 °С.

**Кров'яний агар** – щільне поживне середовище для клінічних та мікробіологічних досліджень.

Кров'яний агар виготовляється на поживній основі для досліджуваного мікроорганізму, наприклад, на основі м'ясо-пептонного агару з додаванням на етапі застигання середовища до 10 % крові тварин або людини (зазвичай кров овець або коня, іноді кроля, рідко кров людини). Після охолодження основного живильного середовища до температури нижче 50 °С до нього додається необхідний обсяг дефібринованої крові, і живильне середовище заливається в чашки Петрі. Рекомендована кількість крові зазвичай становить 50–80 мл (з розрахунку на один літр кров'яного агару) або повинна досягати частки 5–10 % у готовому середовищі. Після додавання крові рН повинен дорівнювати 6,8, щоб збереглися еритроцити.

**Кип'ячений кров'яний агар** (його також називають шоколадним агаром через його забарвлення) – це варіант агару крові, за якого лізис еритроцитів досягається шляхом короткого нагрівання середовища, змішаного з кров'ю, до 80 °С. Під час цього в живильне середовище виділяються фактори крові, і можуть метаболізуватися там бактеріями, які самі по собі не є гемолітичними (наприклад, *Haemophilus influenzae*).

Кров'яний агар застосовується для вирощування, первинної діагностики та з'ясування ступеня гемолітичної активності (або її відсутності) хвороботворних мікроорганізмів. Зазвичай використовується для роботи з мікроорганізмами родів *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Haemophilus*.

## 2. Середовища для культивування грибів

Для вирощування культур грибів у лабораторних умовах застосовують різні середовища. Найбільш розповсюдженими є сусло-агар та глюкозо-картопляний агар. Ці середовища є універсальними і застосовуються не тільки для вирощування грибів, а у різних модифікаціях і для вирощування мікроорганізмів.

**Модифікований картопляно-глюкозний агар (КГА)** (рН 6,5–6,6): картопля – 200 г; глюкоза – 20 г; агар – 20 г; дріжджовий екстракт – 2 г; вода дистильована – до 1 л.

**Кукурудзяний агар (КА)** (рН 7,2–7,3): кукурудзяна мука – 20 г; пептон – 20 г; глюкоза – 20 г; агар – 20 г; вода дистильована – до 1 л.

**Глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА)** (рН 6,6): глюкоза – 25 г, пептон – 3 г, дріжджовий екстракт – 2 г,  $K_2HPO_4$  – 1 г,  $KH_2PO_4$  – 1 г,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,25 г; вода дистильована – до 1 л.

**Глюкозний агар Сабуро** (рН 5,7–5,8): пептон – 10 г; глюкоза – 40 г; агар – 20 г; вода дистильована – до 1 л. Це середовище (агар Сабуро) використовують з метою встановлення і виділення дріжджів, цвілі та інших патогенних грибів, що можуть існувати в людському організмі.

**Агар Чанека–Докса** використовується для культивування грибів та дріжджів. Поживна основа середовища складається з мінеральних солей та вуглеводу (глюкози або сахарози). В ньому немає пептону та поживних екстрактів. Особливістю цього середовища є повільний ріст мікроорганізмів, завдяки чому зручно спостерігати за процесом розвитку культури та ізолювати окремі колонії. Склад середовища на 1 000 г дистильованої води: тростинний цукор – 30 г; монокалій фосфат – 1 г; сульфат магнію – 0,5 г; хлористий калій – 0,5 г; сульфат заліза – 0,01 г.

Артур Докс додав 2 г нітрату натрію, щоб надати єдине джерело азоту. Це робить середовище селективним середовищем росту, оскільки на ньому можуть рости лише ті організми, які можуть використовувати неорганічний азот.

## Питання для контролю знань та самопідготовки

1. Охарактеризуйте живильні середовища. Які компоненти повинні містити живильні середовища?
2. В чому особливість твердих живильних середовищ? Для чого вони застосовуються?
3. Дайте характеристику класифікації живильних середовищ за призначенням.
4. Наведіть класифікацію живильних середовищ за складом.
5. Чим відрізняються живильні середовища, призначені для вирощування мікроорганізмів?
6. У чому особливості поживних середовищ для вирощування грибів?
7. Що таке селективні поживні середовища? Для чого вони призначені?
8. Наведіть рецептури основних живильних середовищ для мікроорганізмів.
9. Наведіть склад живильних середовищ для грибів.

## Лабораторна робота 4. Живильні середовища для глибинного культивування. Склад рідких живильних середовищ

**Загальні відомості.** Вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах називається *культивуванням*. Культивування можна проводити поверхневим або глибинним, періодичним або безперервним методами, в аеробних та анаеробних умовах. Спосіб культивування істотно впливає на застосовувані методи та має велике значення для кінцевої мети експерименту – накопичення біомаси або одержання певного метаболіту.

Для *глибинного* культивування використовують рідкі живильні середовища з метою вивчення фізіолого-біохімічних властивостей штамів мікроорганізмів, для накопичення біомаси та продуктів біосинтезу. Рідкі поживні середовища не містять ущільнювачів. На рідких живильних середовищах біотехнологічне культивування штамів може проходити як поверхневим, так і глибинним методами. Рідкі середовища представлені зазвичай водними розчинами необхідних для життя речовин.

Під час *глибинного* методу використовують рідкі середовища, в яких мікроорганізми розвиваються по всій товщі. Поєднання поживного середовища і мікроорганізмів, які ростуть у ньому, називають *культуральною рідиною*. Оскільки мікроорганізми можуть утилізувати тільки розчинний у воді кисень, розчинність кисню у воді невелика, тому для забезпечення росту аеробів їх необхідно постійно збагачувати киснем. Процес підведення кисню в глибину рідкого середовища називається *аеруванням*, яке здійснюється шляхом продування стерильного повітря через культуральну рідину.

Глибинний метод широко використовується для отримання біомаси мікроорганізмів (пресовані хлібопекарські дріжджі, кормові дріжджі) і різних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів (органічні кислоти, ферменти, антибіотики, амінокислоти).

Примусову аерацію у ферментаторах поєднують із перемішуванням середовища за допомогою мішалок, які обертаються із частотою від десятків до тисяч обертів за хвилину. Це забезпечує максимальний контакт клітин із киснем повітря, із поживними речовинами, різко збільшується поверхність стикання клітин і дає змогу підтримувати максимальну швидкість утворення та виводу метаболітів із клітин.

Глибинне культивування мікроорганізмів може бути:

- *періодичним;*
- *безперервним.*

Під час *періодичного* методу культивування весь об'єм поживного середовища засівають посівним матеріалом або чистою культурою, і вирощування ведуть за оптимальних умов до накопичення потрібної кількості цільового продукту. Спочатку мікроорганізми мають усі поживні речовини, а надалі поступово їх кількість зменшується, і починається отруєння шкідливими продуктами обміну. Через це культура у своєму розвитку проходить чотири фази росту і розмноження, протягом яких змінюються розміри клітин, швидкість розмноження, морфологічні і фізіологічні властивості.

*1. Лаг-фаза – це фаза затримки росту, яка настає відразу після внесення культури мікроорганізмів є живильне середовище. В цій фазі мікроорганізми не розмножуються, а пристосовуються до середовища, проходить підвищення*

вмісту нуклеїнової кислоти, збільшення розміру. Ця стадія є підготовкою до подальшого інтенсивного росту і розмноження.

**2. Фаза логарифмічного росту** характеризується високою швидкістю розмноження клітин, тому що в середовищі багато живильних речовин і мало шкідливих продуктів обміну. Час, який необхідний для подвоєння кількості клітин, називається **тривалістю генерації**. У сприятливих умовах клітини бактерій діляться кожні 20–30 хв, їх кількість збільшується в геометричній прогресії (1, 2, 4, 8, 16).

**3. Стаціонарна (фаза зрілості)**, коли розмноження мікроорганізмів сповільнюється та швидкість розмноження і відмирання врівноважуються, внаслідок чого кількість клітин залишається постійною.

**4. Фаза відмирання**, коли клітини починають гинути і їх кількість знижується через відмирання і автоліз.

Періодичне культивування відбувається у багатьох виробництвах, основаних на життєдіяльності мікроорганізмів. Недоліком періодичного культивування є нераціональні витрати часу на проходження всіх чотирьох стадій розвитку культури, причому період самої активної життєдіяльності – фаза логарифмічного росту – займає невелику частину виробничого циклу.

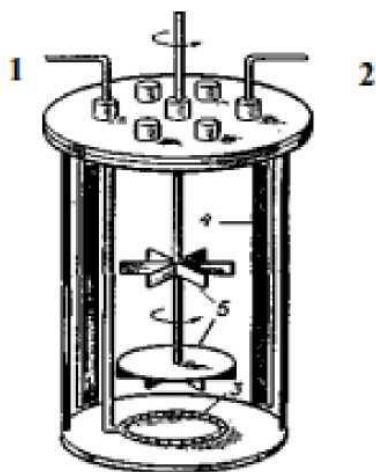


Рис. 14 – Лабораторний ферментатор:

- 1) надходження повітря;
- 2) вихід повітря;
- 3) барботер;
- 4) відбійник;
- 5) мішалка

**Безперервне культивування.** Безперервне глибинне культивування ведуть у лабораторних ферментаторах. Це скляні апарати ємністю від 1 до 10 л, у яких забезпечується безперервна подача стерильного живильного середовища, аерація культуральної рідини стерильним повітрям, автоматичне регулювання температури, рН, піногасіння й інших умов росту. З апарата безупинно виводиться готова культуральна рідина. Процес безперервного вирощування у ферментаторі здійснюється за типами хемостату або турбідостату, які розрізняються способом підтримки культури у стані динамічної рівноваги.

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

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

У режимі турбідостату підтримують постійну концентрацію біомаси. Застосування із цією метою збагачених живильних середовищ дає змогу мікроорганізмам розмножуватися майже з максимальною швидкістю. Однак концентрація клітин за таких умов невисока. До того ж фотометричний контроль щільності клітин вимагає застосування прозорих середовищ, що можливо здійснити лише в лабораторних умовах. Процес глибинного культивування може бути гомогенним

або гетерогенним безперервним. Під час *гомогенного безперервного* процесу у ферментаторі, де йде інтенсивне перемішування, всі параметри (концентрація поживних речовин, клітинний титр та ін.) постійні в часі. Під час *гетерогенного безперервного* процесу застосовують кілька ферментаторів, послідовно з'єднаних між собою. Живильне середовище подається в перший ферментатор, готова культуральна рідина виходить з останнього. У цьому випадку відбувається безперервний потік середовища, але клітини не забезпечені постійними умовами росту (скільки апаратів, стільки й умов культивування). У таких умовах процес вирощування культури безперервний лише в технологічному, але не у фізіологічному аспекті. Спосіб знайшов широке застосування під час одержання спирту й біомаси дріжджів.

Глибинне культивування має низку переваг, порівняно з поверхневим:

- *для міцелію, що росте в товщі живильного середовища, створюються однакові умови (хімічні, фізичні);*
- *механічне перемішування середовища і безперервна аерація сприяють зростанню міцелію і накопиченню продуктів обміну;*
- *скорочується термін ферментації і збільшується кількість одержуваного продукту через збільшення обсягу рідини і застосування ферментерів різного типу, що дають змогу регулювати ферментаційний процес.*

Тобто глибинне культивування – вирощування на шейкерах, які забезпечують струшування або обертання колб або пробірок, сприяючи більшому зіткненню середовища з повітрям і насиченню їх киснем. Під час безперервного культивування теоретично бактерії ростуть експоненціально в умовах постійної подачі свіжого середовища та видалення частини клітин разом зі старим середовищем, так що обсяг культури згодом не міняється.

**Середовища для глибинного культивування.** Найчастіше для глибинного культивування мікроорганізмів та грибів використовуються такі середовища:

**М'ясо-пептонний бульон (МПБ)** – рідке поживне середовище для культивування мікроорганізмів, яке складається із води та пептона (1–2 %); слугує основою багатьох інших поживних середовищ.

Методика приготування МПБ: використовують м'ясний бульйон, 1 л води, нагрівають до 50 °С, настоюють 12 год за кімнатної температури або 1 год за 50–55 °С. Екстракт проціджують, кип'ятять протягом 30 хв для згортання колоїдних білків і фільтрують двічі. Фільтрат доливають водою до 1 л, розливають у колби, закривають ватними пробками і стерилізують за 120 °С протягом 20 хв.

**М'ясна вода, або поживна вода (ПВ).** Свіже м'ясо заливають 1 л води, настоюють 16–24 год. М'ясний настій зливають, віджимають м'ясо, кип'ятять на слабкому вогні та фільтрують через паперовий фільтр. Прозору, солом'яно-жовтого кольору рідину зливають у вимірювальний циліндр, доливають водопровідною водою до необхідного об'єму.



Рис. 15 – Поживна вода (ПВ)

Отриману в такий спосіб м'ясну воду стерилізують у склянках, закритих ватно-марлевими пробками, 20 хв за температури

120 °С або текучою парою. Стерильна м'ясна вода є основою для приготування багатьох живильних середовищ. Стерилізована поживна вода може зберігатися тривалий час.

**Селенітовий бульйон Лейфсона** – рідке поживне середовище для накопичення сальмонел. Селеніт пригнічує розвиток більшості бактерій, але не інгібує розвиток сальмонел. Особливістю середовища є швидкість проведення аналізу, селективне накопичення проводиться протягом 6 годин. Ключовим фактором у роботі середовища є рівень рН. Для підтримання кислого рівня рН у середовище додано маніт, із якого мікроорганізми утворюють кислоту.

**Глюкозо-пептонне середовище** – рідке поживне середовище для накопичення ентеробактерій. Якісний склад середовища являє собою поживну базу для росту бактерій, забезпечуючи їх всіма необхідними речовинами, в якості джерела вуглецю включено глюкозу, що дає змогу накопичувати широкий спектр мікроорганізмів. Їх розвиток, окрім помутніння, також легко виявити за зміною середовища із зеленого на жовте, а застосувавши скляний «поплавок», виявити утворення газу.

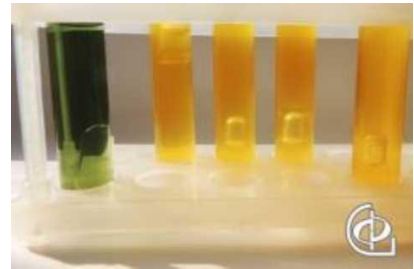


Рис. 16 – Глюкозо-пептонне середовище

**Біфідум середовище** – рідке поживне середовище, склад якого збалансований для максимального накопичення біфідобактерій. Присутні у матеріалі біфідобактерії утворюють характерні колонії у вигляді «комет, гвіздків, тяжів і кульок», розташовані по всьому об'єму середовища.

**Сольовий бульйон** – рідке поживне середовище з високою концентрацією хлористого натрію. Така концентрація пригнічує ріст багатьох мікроорганізмів, проте не діє на стафілококів і дає їм виключні умови для розвитку.

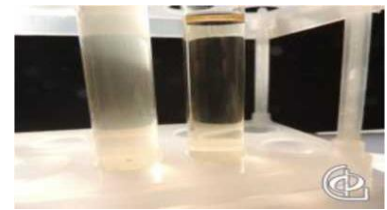


Рис. 17 – Сольовий бульйон

Накопичення проводиться протягом 42 годин при 37°С. Ефективність накопичення можна спостерігати наочно за помутнінням середовища.

### Питання для контролю знань та самопідготовки

1. Чи можливе глибинне культивування у твердому середовищі та поверхневе культивування у рідкому середовищі?
2. У чому суть глибинного культивування?
3. Які переваги глибинного культивування?
4. Що таке аерування?
5. Що таке культуральна рідина?
6. Який склад мають рідкі поживні середовища?

## Лабораторна робота 5.

### Приготування маточних розчинів для середовища Мурасиге і Скуга

**Основні відомості.** Живильне середовище – основний фактор успішного культивування ізольованих органів, тканин і клітин рослин. Основними компонентами живильних середовищ є мінеральні солі (макро- і мікроелементи), джерело вуглеводного живлення (зазвичай сахароза або глюкоза), вітаміни та регулятори росту (табл. 8.1). Для вирощування *in vitro* рослин і клітин найчастіше використовують середовище Мурасиге і Скуга (МС).

Для зручності і прискорення процесу приготування живильного середовища доцільно заздалегідь приготувати концентровані (маточні) розчини макро- і мікро-солей, вітамінів і регуляторів росту. Розчини зберігають у холодильнику за 2–4 °С у посуді з темного скла не більше 4–6 тижнів.

**Таблиця 1.** Середовища для культивування *in vitro* рослин і калусної тканини (мг/л)

Компоненти	Середовище МС для рослин	Середовище № 1 для калюсу	Середовище № 2 для калюсу
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650	1 650	1 650
KNO <sub>3</sub>	1 900	1 900	1 900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	440	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	37,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6	6	6
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
KI	0,83	0,83	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3
Мезоінозит	100	100	100
PP	0,5	0,5	0,5
B <sub>1</sub>	0,1	0,1	0,1
B <sub>6</sub>	0,5	0,5	0,5
НОК			2
2,4-Д		3	2
Кінетин		1	1
Сахароза	30 000	25 000	25 000
Агар	0,7 %	0,7 %	0,7 %
pH	5,6–5,8		

1 – Середовище для калюсу картоплі.

2 – Середовище для калюсу гвоздики, тютюну, топінамбура, сої, моркви.

Маточні розчини макросолей готують у концентраціях, що у 10 разів перевищують потрібні. Зберігають у стерильному посуді або у замороженому стані.

*Маточні розчини мікросолей* готують у концентраціях, що у 100 разів перевищують потрібні, з розрахунку, щоб у 1 мл маточного розчину містилась маса речовини, потрібна для приготування 1 л середовища. Об'єм цих розчинів має бути 0,1 л.

Для виготовлення маточних розчинів кожену сіль зважують і розчиняють окремо у новій порції бідистильованої води.

*Розчини вітамінів* готують у концентрації 1 мг/мл. Розчиняють у бідистильованій воді.

*Розчини фітогормонів* готують так: цитокиніни (кінетин, зеатин, БАП) спочатку розчиняють у невеликій кількості 1 N розчину лугу або кислоти, ауксини (ІОК, НОК, 2,4-Д) – у краплі етанолу, підігрівують і додають відповідний об'єм бідистильованої води; гібереліни розчиняють у бідистильованій воді. Концентрація розчинів фітогормонів 1 мг/мл.

Розчини вітамінів і фітогормонів (ІОК, зеатин, гіберелін) розливають по 3–5 мл і зберігають у замороженому стані.

Вуглеводи і органічні добавки зважують і додають безпосередньо до середовища.

**Матеріали, реактиви, обладнання:**  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2,4-Д, кінетин,  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_6$ , РР, спирт, 1 N  $\text{HCl}$  і 1 N  $\text{KOH}$ , ваги, магнітний змішувач, плитка, лопатки (шпателі), лабораторний посуд – склянка або колба місткістю 1 л, мірні циліндри місткістю 500 і 100 мл, мірні піпетки на 5 і 1 мл, пляшки з темного скла 1 л, 100, 50 і 25 мл.

Для розчинів макросолей і вітамінів бажано використовувати стерильний посуд.

**Мета роботи.** Приготувати маточні розчини макро- і мікросолей, вітамінів, фітогормонів, Fe-хелату.

**Перебіг роботи.** Живильні середовища готують на бідистильованій або дистильованій воді.

1. Приготувати розчини макро- і мікроелементів для середовища МС. Для приготування запасних розчинів макроелементів і мікроелементів зважують вказані в таблиці кількості солей.

**Таблиця 2. Наважки солей, необхідні для приготування запасних розчинів**

Макроелементи		Мікроелементи	
Сіль	Наважка, г	Сіль	Наважка, мг
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16,5	$\text{H}_3\text{BO}_3$	620
$\text{KNO}_3$	19,0	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 230
$\text{CaCl}_2$	3,3	$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	860
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,2	$\text{KI}$	83
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,7	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5
Вода бідистильована	до 1 л	Вода бідистильована	до 100 мл

2. Для приготування 100 мл розчину Fe-хелату зважують 557 мг  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та 745 мг  $\text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Наважки розчиняють окремо у бідистиляті, зливають і доводять до кипіння.

3. Готують запасні розчини фітогормонів 2,4-Д і кінетин, для чого наважки речовин масою 100 мг розчиняють у 100 мл бідистиляту.

4. Для приготування маточних розчинів вітамінів В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> і РР 10 мг речовин розчиняють у 10 мл бідистильованої води.

### **Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Які групи речовин входять до складу живильного середовища для вирощування *in vitro* клітин, тканин та органів рослин?

2. Назвіть основні живильні середовища, які використовують для культивування ізольованих клітин, тканин та органів рослин.

3. Чому до складу більшості середовищ залізо додають у хелатованій формі?

4. Які азотовмісні сполуки використовують як джерела азоту у живильних середовищах для культивування *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів? Вітаміни якої групи найважливіші для росту ізольованих рослинних тканин?

5. Які вуглеводи і у якій концентрації є найкращим джерелом вуглеводного живлення для більшості рослинних тканин?

## Лабораторна робота 6. Приготування середовища Мурасиге і Скуга

**Основні відомості.** Приготування живильних середовищ вимагає особливої ретельності і послідовності у роботі.

Після змішування усіх компонентів (мінеральних солей, вуглеводів, вітамінів і регуляторів росту) у середовище додають воду до потрібного об'єму і доводять рН до 5,6–5,8 (зазвичай 1 N КОН).

Значення рН середовища впливає на стійкість та засвоєння низки складників середовища. Для більшості рослинних тканин значення рН становить від 5,0 до 6,0, а оптимальне – 5,6–5,8. Величину рН середовища перед автоклавуванням доводять до 5,5–6,0, оскільки під час автоклавування вона трохи зменшується внаслідок утворення цукрових кислот. Середовища стерилізують автоклавуванням або фільтруванням.

**Мета роботи:** ознайомитися з методами приготування живильного середовища Мурасиге і Скуга (МС) і його автоклавування.

**Матеріали, реактиви, обладнання:** маточні розчини макро- і мікроелементів, Fe-хелату та вітамінів, мезоінозит, сахароза, агар, 1 N HCl і 1 N КОН, терези, шпателі, магнітний змішувач, рН-метр, плитка, автоклав, склянка або колба місткістю 1 л, мірчі циліндри місткістю 500 і 100 мл, мірчі піпетки на 5 і 1 мл, ватні пробки або фольга.

**Перебіг роботи.** Для приготування 1 л середовища МС необхідні такі кількості компонентів (табл. 3).

**Таблиця 3. Кількості компонентів, необхідні для приготування середовища Мурасиге і Скуга**

Компонент	Кількість
Розчин макроелементів	100 мл
Розчин мікроелементів	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Розчин вітаміну В <sub>1</sub>	0,1 мг
Розчин вітаміну В <sub>6</sub>	0,5 мг
Розчин вітаміну РР	0,5 мг
Мезоінозит	100 мг
Сахароза	30 г (3 %)
Агар	7 г

Для приготування 1 л середовища МС колбу або склянку місткістю 1 л помістити на магнітний змішувач, налити 250–300 мл бідистиляту і додати потрібну кількість розчинів солей макро- і мікроелементів, Fe-хелату, вітамінів і фітогормонів, якщо останні входять до складу середовища.

Далі зважити потрібну кількість мезоінозиту, сахарози і органічних добавок, якщо вони входять до складу середовища. Кожну наважку розчинити в окремій порції бідистильованої води. рН приготовленого середовища довести до 5,6–5,8 за допомогою 1 N КОН або 1 N HCl. Наважку агару помістити у термостійку колбу

або склянку, залити холодною бідистильованою водою (300–400 мл), залишити на 20 хв для набухання та нагріти, постійно помішуючи, до повного розчинення агару. *Для приготування рідкого середовища агар не додається!*

Далі додати розчинений агар до рідкого середовища і довести до потрібного об'єму бідистильованою водою. Розчин і воду підігріти. Розлити тепле середовище у колби або пробірки і закрити ватними пробками або фольгою.

Отримане розлите середовище стерилізувати в автоклаві за умови тиску 0,8–1,0 атм (температура 115–120 °С ) 20–25 хв залежно від об'єму. Після закінчення стерилізації середовища в автоклаві повільно зменшити тиск в апараті і відкрити кришку лише після того, як внутрішній тиск дорівнюватиме зовнішньому (на манометрі стрілка вказуватиме на 0). Інакше за різкої зміни тиску середовище може змочити, або навіть виштовхнути пробки.

### **Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Якими є оптимальні межі величини рН середовища для більшості рослинних культур?
2. На які процеси впливає величина рН середовища?
3. Які типи культур особливо чутливі до величини рН?
4. Які полісахариди використовують для приготування твердих середовищ?

## Лабораторна робота 7.

### Методи стерилізації посуду, інструментів і допоміжних матеріалів

**Основні відомості.** Чистота і стерильність – головні вимоги роботи в біотехнологічній лабораторії. Стерилізація приміщення, ламінарних боксів, інструментів, посуду, живильних середовищ, рослинного матеріалу на всіх етапах роботи є основою успіху, і в багатьох випадках набагато важливіша, ніж спеціальне обладнання.

**Мета роботи:** оволодіти основними способами стерилізації посуду, інструментів і допоміжних матеріалів.

**Матеріали, реактиви, обладнання:** колби, пробірки, чашки Петрі, мірчі піпетки, скальпелі, пінцети, 96° спирт, папір для загортання посуду, целофан, фільтрувальний папір, металевий або скляний пенал для інструментів, спиртівка, термостат, автоклав, ламінар-бокс.

**Перебіг роботи.** Стерилізація посуду та обладнання може здійснюватися різними методами. Метод стерилізації обирається залежно від мети роботи та особливостей обладнання.

#### Стерилізація посуду

**Стерилізація сухим жаром.** Лабораторний посуд (колби, пробірки, чашки Петрі тощо) перед наповненням живильним середовищем попередньо стерилізують сухим жаром у сушильній шафі. Піпетки зручно стерилізувати в скляних пеналах, на дно яких необхідно покласти вату, щоб запобігти обламуванню носиків піпеток. Тривалість стерилізації: за 150 °С – 2,5 год, за 160 °С – 2 год, за 170 °С – 1 год.

**Стерилізація сухим паром.** Посуд, загорнутий у папір або з ватними тампонами, стерилізують автоклавованням. Під час автоклавовання піпеток верхню частину закривають ватним тампоном (приблизно на 2 см) і кожну окремо загортають у папір. Залежно від заповнення автоклава автоклавовання триває 30–40 хв за умови тиску 2 атм і температури 133 °С.

#### Стерилізація інструментів

**Стерилізація сухим жаром.** Інструменти попередньо стерилізують сухим жаром у сушильній шафі так само, як і посуд.

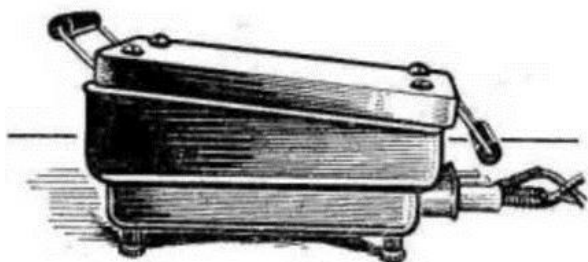


Рис. 19 – Стерилізатор



Рис. 18 – Сушильна шафа

**Кип'ятіння** є одним з найпростіших способів стерилізації. Проводиться у стерилізаторі – металевій прямокутній коробці з кришкою і сіткою на дні для розташування предметів, що стерилізуються. У нього наливають воду та нагрівають до кипіння. Кип'ятіння триває від 15–30 хв до 2 г за температури

100 °С. Кип'ятінням стерилізують дрібні металеві або скляні предмети – шприци, голки, скляні трубки тощо. Під час такої стерилізації гинуть вегетативні форми мікроорганізмів і частина спор. Кип'ятінням у дистилаті стерилізують мембранні фільтри. Режим стерилізації для мембранних фільтрів 30–60 хв з моменту енергійного закипання води. У мікробіологічній практиці таким способом стерилізації користуються рідко через те, що тривале кип'ятіння може пошкодити оброблюваний матеріал, а скорочення часу кип'ятіння може не забезпечити стерильності.

**Стерилізація полум'ям (фламбірування** – від нім. *flamme* – полум'я). У боксі безпосередньо перед роботою інструменти занурюють у порцеляновий стакан із 96 ° спиртом і стерилізують обпалюванням у полум'ї спиртівки. Стерильний інструмент використовують лише для одноразової маніпуляції. Перед повторним використанням його знову необхідно простерилізувати спиртом і обпалити. Це найбільш швидкий і доступний метод стерилізації. Проте його використання поширюється тільки на термостійкі матеріали. Так стерилізують бактеріологічні петлі, металеві пінцети, скляні шпателі, палички, скельця, фарфорові ступки та інші інструменти. Під час прожарювання гинуть усі мікроорганізми (вегетативні та спорові форми). Після прожарювання охолоджені предмети не можна класти на стіл; їх слід тримати так, щоб вони не торкалися інших предметів.



Рис. 20 – Полум'яний стерилізатор

### **Стерилізація допоміжних матеріалів**

Вату, пробки, марлю, папір, целофан, фольгу стерилізують автоклавуванням.

Перед початком операцій ламінарний бокс необхідно підготувати до роботи. Для цього упродовж 30 хв його стерилізують ультрафіолетом, після чого робочу поверхню протирають 70–96° спиртом.

### **Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Який посуд використовують для роботи з культурою ізолюваних клітин, тканин та органів рослин?
2. Як здійснюється стерилізація посуду та допоміжних матеріалів?
3. Назвіть методи стерилізації інструментів.

## Лабораторна робота 8.

### Методи стерилізації живильних середовищ. Пастеризація, стерилізація

**Основні відомості.** Мета процесу стерилізації живильних середовищ полягає в повному знищенні всіх живих мікроорганізмів і спор усередині або на поверхні об'єкта. *Стерилізація* (від латин. *sterilis* – безплідний, слово «стерилізація» в перекладі означає знепліднення) – це знищення мікроорганізмів у різних об'єктах шляхом дії на них чинниками, згубними для живих організмів. Усі засоби стерилізації поділяють на:

- фізичні;
- механічні;
- хімічні;
- термічні;
- холодні.

Вибір відповідного засобу залежить від властивостей об'єкта стерилізації. **Термічна** стерилізація базується на знищенні мікроорганізмів за допомогою високих температур. Така стерилізація найчастіше використовується у практичній діяльності людини та застосовується в мікробіологічній практиці. Під час цього потрібно пам'ятати, що у вегетативних (неспорових) клітинах денатурація білків і загибель починається вже за температури 56–60 °С. Більш термостійкі спори гинуть у сухій атмосфері за температури 160 °С протягом 1–2 год, а у вологому середовищі загибель спор відбувається за температури 112–120 °С протягом 20–30 хв. Низькі температури не вбивають, а лише затримують розвиток мікроорганізмів. Холодні методи стерилізації включають різноманітні методи знищення мікроорганізмів. Називають їх холодними умовно, щоб підкреслити, що вони не пов'язані з дією високих температур. До цих засобів відносять хімічну стерилізацію, або дезінфекцію, різні фізичні методи стерилізації (окрім використання температурного фактора) та механічне звільнення від мікроорганізмів.

**Мета роботи:** оволодіти основними способами стерилізації живильних середовищ.

**Матеріали та обладнання:** колби та пробірки з живильним середовищем, автоклав, апарат Коха, бактеріальні фільтри.

**Перебіг роботи.** До методів термічної стерилізації належать:

- 1) стерилізація текучою парою;
- 2) стерилізація парою під тиском;
- 3) пастеризація;
- 4) дробова стерилізація та тиндалізація.

**Стерилізація текучою парою.** Проводиться гарячим вологим повітрям у апараті Коха. У нижню частину металевого циліндра наливають воду, над нею розташовують полицю з отворами і матеріал, що стерилізується. Апарат щільно закривають конічною кришкою з отвором для виходу пари і нагрівають на вогні. Коли вода закипить, гаряча водяна пара з температурою приблизно 100 °С «потече» сильним струменем з отвору кришки. З цієї миті відраховують час початку стерилізації. Стерилізація текучою парою триває від 45 хв до 1,5 год залежно від об'єму матеріалу, що стерилізується. У такий спосіб стерилізують поживні середовища, які не можна нагрівати вище 100 °С (наприклад, м'ясо-пептонний желатин).

Цей засіб стерилізації недостатньо надійний – повністю гинуть лише вегетативні форми мікроорганізмів, а спори зберігаються. Для досягнення повної стерилізації середовища в апараті Коха застосовують дробову стерилізацію.

**Дробова стерилізація (тиндалізація)** використовується для стерилізації живих середовищ і розчинів, які псуються під час застосування температур вище 100 °С. Матеріал стерилізується в декілька прийомів.

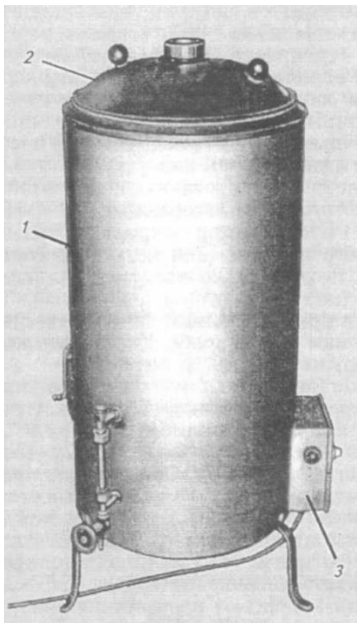


Рис. 21 – Апарат Коха:  
1 – паровий котел,  
2 – кришка,  
3 – блок нагріву

Дробовим може бути кип'ятіння або стерилізація текучою парою в апараті Коха. Метод розроблений Дж. Тиндалем. Матеріал стерилізують за 100 °С протягом 10 хв. За цей час усі вегетативні клітини гинуть, життєздатними залишаються тільки спори. Далі рідину охолоджують до температури, оптимальної для проростання спор (30 °С), і через декілька годин знову пропускають пару. Двох-трьох подібних циклів зазвичай буває достатньо для знищення всіх спор. Тиндалізацію зазвичай проводять 3 дні по 30 хв щодня, а в перервах залишають матеріал за кімнатної температури. Це робиться для провокування проростання спор у вегетативній формі і їх знищення під час подальших обробок, що підвищує надійність цих засобів.

**Стерилізація парою під тиском.** Проводиться насиченою водяною парою в автоклаві. Автоклави бувають різної конструкції, але засновані на одному принципі.

Це металева посудина з двошаровою стінкою, здатна витримувати високий тиск.

Внутрішня частина посудини – стерилізаційна камера, в яку поміщають матеріал, що стерилізується. Вона оточена водопаровою камерою, яка має кран для виходу повітря і пари. Під час стерилізації у водопарову камеру наливають воду до необхідного рівня. Предмети у камері слід розміщувати не дуже щільно, оскільки пара повинна вільно проходити між ними. Кришка автоклава герметично закривається.

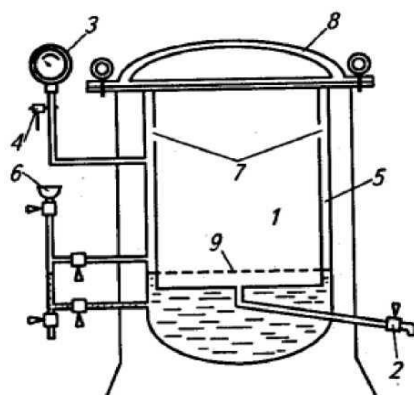


Рис. 22 – Автоклав:  
1 – камера стерилізації; 2 – кран для виходу повітря;  
3 – манометр; 4 – запобіжний клапан; 5 – камера;  
6 – лійка для заповнення автоклава водою; 7 – отвори для надходження пари в камеру стерилізації; 8 – кришка автоклава; 9 – підставка для розміщення матеріалів, що стерилізуються

Найпоширеніші режими стерилізації такі:

- 15–45 хв за надлишкового тиску 0,5 атм (температура досягає 110–112 °С);
- 15–45 хв за надлишкового тиску 1,0 атм (температура досягає 121 °С);
- 10–30 хв за надлишкового тиску 1,5 атм (температура досягає 126 °С).

Після закінчення часу стерилізації нагрівання припиняють, відкривають паровий клапан і спускають пару. Стерилізують паром під тиском поживні середовища, скляний посуд, інструменти тощо. Автоклавовання є швидким і надійним способом стерилізації, за якого гинуть усі форми мікроорганізмів, навіть найстійкіші спори.

**Пастеризація.** Цей спосіб часткової стерилізації названий на честь французького вченого Л. Пастера. Він полягає в тому, що рідину, налиту в стерильний посуд, прогрівають на водяній бані за температури 60–90 °С протягом 10–30 хв. Застосовують пастеризацію для середовищ, які змінюють свої фізико-хімічні властивості за високих температур. У лабораторній практиці в такий спосіб відокремлюють види мікроорганізмів, що утворюють спори, від тих, що не утворюють. У лабораторних умовах пастеризацію проводять або на водяній бані, або в термостаті за таких режимів: 60–70 °С 30 хв або 80 °С 10–15 хв.



Рис. 23 – Водяна баня

Інший різновид – **дробова пастеризація** проводиться у водяній бані за температури 56–58 °С протягом 1 год з 5–6-кратним повторенням через 24 год. В інтервалах між прогріваннями матеріал витримується за кімнатної температури. Так пастеризують поживні середовища, бідні мікроорганізмами, а також середовища, що містять речовини, які легко руйнуються і денатурують за температури вище 60 °С (білки, вітаміни).

За **холодної стерилізації** використовують хімічні речовини або діють на об'єкт чинниками хімічної природи. Хімічні методи припинення життєдіяльності мікроорганізмів базуються на використанні антисептиків, що мають неспецифічний ефект, або використанні антибіотиків і синтетичних антимікробних препаратів з вибірковою протимікробною дією. Загибель мікроорганізмів під час дезінфекції відбувається здебільшого внаслідок гідролізу компонентів клітин, коагуляції білків, інактивації клітинних ферментів.

Метод хімічної стерилізації застосовують для дезінфекції рук, робочого столу, відпрацьованих скелець тощо. До антисептиків або дезінфікуючих засобів належать мило, деякі органічні барвники, солі важких металів, окисники (хлор, йод, перекис водню, перманганат калію), формалін, спирти (60–70 % водні розчини), кислоти, антибіотики, газоподібні речовини (формальдегід, окис етилену, озон) та ін. Стійкість мікроорганізмів до їх дії може суттєво змінюватися залежно від таких факторів: концентрація активного компонента, тривалість контакту, рН, температура, вологість.

**Фізичні методи стерилізації.** Це стерилізація ультрафіолетовими променями, радіоактивним випромінюванням, ультразвуком, струмом ультрависокої частоти тощо. Ці методи широко використовують у медицині. Стерилізація з використанням опромінення придатна для термолабільних матеріалів. Ультрафіолетові промені використовуються для стерилізації центрифугальних пробірок, наконечників для піпеток та ін. виробів із термолабільної пластмаси. Час опромінення

визначається потужністю лампи, часом дії, кількістю і видовим складом мікроорганізмів забрудненого матеріалу. Вегетативні форми чутливіші до опромінення, ніж спори, які в 3–10 разів більш стійкі. Від УФ-випромінювання мікроорганізми можуть бути захищені органічними речовинами, пилом або іншими захисними оболонками. Обмеженням для використання цього методу стерилізації є низька проникна здатність УФ-променів і висока поглинальна здатність води та скла.

Для знезараження повітря використовують бактерицидні лампи. Зважаючи на можливу несприятливу дію ультрафіолетових променів на організм людини, бактерицидні лампи вмикають лише за умови відсутності людей у приміщенні. Рентгенівське і  $\gamma$ -опромінювання також ефективно для стерилізації пластмас, харчових продуктів, але вимагає суворого дотримання правил безпеки. Найбільш чутливі до  $\gamma$ -опромінення вегетативні клітини бактерій, далі йдуть цвілеві гриби, дріжджі, бактерійні спори і віруси.  $\gamma$ -опромінення використовується для стерилізації лікарняного приладдя, антибіотиків, вітамінів, гормонів, стероїдів, пластмасового разового устаткування, шовного і перев'язувального матеріалу.

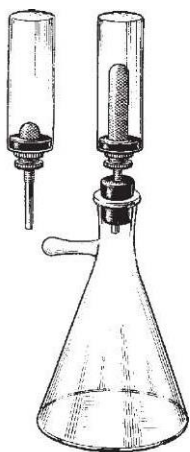


Рис. 23 – фільтр Шамберлана

**Механічний метод стерилізації (стерилізація фільтруванням)** застосовується в тих випадках, коли субстрати не витримують нагрівання і дії хімічних речовин (білки, сироватки, антибіотики, вітаміни, леткі речовини та ін.). Метод полягає у пропусканні рідин і газів через спеціальні дрібнопористі фільтри (бактерійні), діаметр пор яких не перевищує 0,45–0,2 мкм. Фільтри затримують мікроорганізми. Для пропускання розчину через фільтр потрібний вакуум або тиск. Існують два основні типи фільтрів – глибинні і мембранні. Глибинні складаються з волокнистих або гранульованих матеріалів, які спресовані, звиті або зв'язані в лабіринт проточних каналів. Частки затримуються в них внаслідок адсорбції і механічного захоплення в матриці фільтра.



Рис. 24 – Фільтр Зета

Мембранні фільтри мають безперервну структуру, і захоплення ними часток визначається розміром пор. Фільтри містять різні природні (коалін, азбест, целюлоза) або синтетичні (похідні целюлози) матеріали. До таких дрібнопористих фільтрів, розміри пор яких менше розмірів бактерій, належать фільтри Шамберлана (фільтрувальні свічки) з каоліну, пластинчасті азбестові фільтри Зета.

Мембранні фільтри виготовляють з колодію, ацетату чи нітрату целюлози та інших матеріалів. Фільтри закріплюються у спеціальному утримувачі (приладі Зейтца), який вставляється у приймач фільтрату – колбу Бунзена. Фільтр Зейтца автоклавують у зібраному вигляді. Перед стерилізацією фільтр утримувачем, гумовою пробкою і колбою-приймачем загортають у папір. У відповідну трубку, яка буде приєднана до вакуумного насоса, вставляють ватний тампон. У мікробіологічній лабораторії та особливо на виробництві постійно здійснюється контроль ефективності стерилізації. Для цього визначають кількість клітин, які вижили після стерилізації, методом посіву в чашки за кількістю колоній, що утворюються.

Використовують також і спеціальні біологічні індикатори (бактеріальні спори), які за визначених умов стерилізації гинуть із прогнозованою швидкістю.

### **Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Охарактеризуйте методи стерилізації живильних середовищ. На які групи поділяються ці методи?
2. Наведіть характеристику стерилізації текучою парою. Які переваги та недоліки цього методу?
3. Що таке дробова стерилізація? Коли вона застосовується?
4. Охарактеризуйте стерилізацію під тиском. Як здійснюється автоклавування?
5. Що таке пастеризація? Коли вона застосовується? У яких випадках здійснюють дробову пастеризацію?
6. Які методи належать до методів фізичної стерилізації? Охарактеризуйте їх ефективність.
7. Наведіть основні механізми та принципи хімічної стерилізації.
8. Який спосіб стерилізації називають механічним? Як здійснюється механічна стерилізація і коли застосовується?

## Лабораторна робота 9. Чисті культури мікроорганізмів. Отримання чистих культур на прикладі грибів

**Основні відомості.** Чиста культура – це популяція клітин одного і того ж виду мікроорганізмів, що утворюються з однієї клітини внаслідок її розмноження. Для того, щоб одержати чисту культуру, необхідно ізолювати окрему мікробну клітину, і потім, створивши сприятливі умови для її розмноження, отримати з неї чисту культуру цього виду мікроорганізмів. Тобто чиста культура являє собою ізольовану популяцію мікроорганізмів, що розмножились з однієї клітини.

**Культура мікроорганізмів** – це мікроорганізми, розмножені на живильному середовищі в лабораторних умовах. Культури мікроорганізмів мають штучний, лабораторний характер.

Внесення клітин мікроорганізмів або будь-якого досліджуваного матеріалу до стерильного поживного середовища для отримання чистої або накопичувальної культури називають **посівом**. Перенесення вже вирощених клітин з одного середовища на інше (стерильне) називають **пересіванням**, або **пасивуванням**. Мікроорганізми вирощують за певної постійної температури, таке культивування називається **інкубацією**.

Виділення чистих культур мікроорганізмів є необхідним для правильного уявлення про їх морфологічні, культуральні і фізіологічні та біохімічні властивості для визначення видової належності. Виділення чистої культури включає три етапи:

1. *Одержання накопичувальної культури.*
2. *Виділення чистої культури.*
3. *Визначення чистоти виділеної культури.*

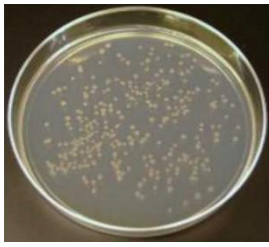
Для одержання накопичувальної культури певного виду бактерій використовують селективні поживні середовища і здійснюють посів досліджуваного субстрату.

Метод виділення чистих культур висівом на тверді поживні середовища зводиться до того, що під час розмішування розведеного висівного матеріалу в розплавленому твердому середовищі мікробні клітини розподіляються більш-менш далеко одна від одної. Після застигання поживного середовища окремі клітини закріплюються у ньому у визначеному місці. Кожна ізольована в такий спосіб клітина розмножується на тому місці, куди потрапила, утворюючи накопичення клітин одного виду. Таке скупчення клітин називається **колонією**. Колонії видно неозброєним оком.

Кожна колонія, яка утворилася з однієї клітини, є чистою культурою, яку необхідно ізолювати в окрему пробірку з поживним середовищем. У природному середовищі і в організмі хазяїна сапротрофи та паразити самотійно знаходять собі необхідні умови для життєдіяльності. Проте інколи доводиться отримувати популяції мікроорганізмів у штучних умовах. Такі популяції називають **культурами**.

**Мета роботи:** ознайомитися з методами отримання чистих культур мікроорганізмів, посіву та пересіву їх на тверді та рідкі живильні середовища.

**Перебіг роботи.** Важливим етапом біотехнологічного процесу, незалежно від природи продуцентів, є отримання їх чистих культур. В основі цих методів лежить принцип Р. Коха, згідно з яким чисту культуру можна виділити з окремої



**А**



**Б**

Рис. 25 – Колонії мікроорганізмів  
А – кишкова паличка; Б – сінна паличка

різняти неможливо. Рідке середовище із клітинами, що там ростуть, називається **культуральною рідиною**. У пробірках мікроорганізми культивують як у рідких, так і на твердих середовищах. Рідким середовищем для аеробних культур заповнюють 1/3 пробірки, для анаеробних – 2/3. Якщо тверде середовище в пробірках призначене для подальшого вирощування мікроорганізмів, під час підготовки до стерилізації його наливають на 1/3–1/4 об'єму пробірок. Після стерилізації пробірки зі ще не застиглим середовищем розкладають на рівній поверхні столу з нахилом (під невеликим кутом) для отримання скошеної поверхні агару. Це так звані «косяки» – скошене середовище. Тверде середовище, застигле за вертикального положення пробірки, називається **стовпчиком**. Стівпчики поживного середовища, що займає 1/3–1/4 об'єму пробірки, використовують для посіву культури уколом. Стівпчики поживного середовища, що займають 2/3 об'єму пробірки, після стерилізації застосовують для заливки стерильних чашок Петрі, призначених для

колонії (клону). **Клон** – це генетично однорідне потомство, отримане розмноженням однієї клітини. Окремі колонії отримують розрідженим висіванням бактерій на тверде живильне середовище різними методами.

Вирощують мікроорганізми в скляному посуді – пробірках, колбах або чашках Петрі. На рідких середовищах колонії роз-

мікробіологічних посівів.

За культивування мікроорганізмів у колбах використовують тільки рідке живильне середовище. Для аеробних мікроорганізмів середовище наливають тонким шаром, для анаеробних мікроорганізмів колбу заповнюють на 2/3 об'єму.

У чашках Петрі мікроорганізми культивують лише на твердому середовищі. Для роботи з мікроорганізмами використовують спеціальні бактеріологічні голки, петлі і шпатель. Під час посівів і пересівань культур мікроорганізмів із колоній, що виростили на твердому середовищі або вросли в субстрат, застосовують голки або шпатель. Суспензії мікроорганізмів беруть петлею.

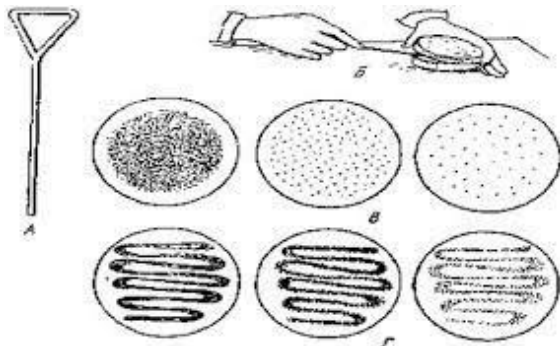


Рис. 26 – Методи посіву мікроорганізмів на чашку Петрі:

А – шпатель Дригальського, Б – посів шпателем по всій поверхні за різних розведень культуральної рідини (В), Г – посів петлею методом штриха.

Суспензії мікроорганізмів беруть петлею.

Найбільш поширеним способом виділення чистих культур є непрямі методи, засновані на ізоляції однієї мікробної клітини від маси мікроорганізмів і наступному вирощуванні потомства цієї клітини на поживних середовищах ізольовано від інших видів. Для посіву частіше використовуються агаризовані поживні середовища в чашках Петрі. Цей метод запропонований відомим німецьким мікробіологом Кохом і називається **методом пластинчастих (або чашкових) культур Коха**.

**Метод Коха** можна використовувати лише для тих мікроорганізмів, які здатні рости на твердих живильних середовищах. Чисту культуру із накопичувальної одержують з окремої колонії. Із накопичувальної культури після її розведення здійснюють посів на тверде середовище за методом Коха. Кожну колонію, що виросла, вважають потомством однієї клітини. Біомасу з окремих, добре ізольованих колоній відсівають петлею в пробірки на поверхню зкошеного твердого поживного середовища. Чистоту культури перевіряють одночасно декількома способами: візуально, мікроскопуванням і висівом на поживних середовищах. Під час візуального контролю визначають характер росту культури на поверхні штриха на скошеному агарі: якщо він однорідний, то культура вважається **чистою**, якщо неоднорідною – **забрудненою**. Мікроскопічний контроль: якщо в препараті всі клітини морфологічно однорідні, культура чиста. Чистоту культури перевіряють також посівом на поживні середовища. Однорідність характеру росту колоній свідчить про чистоту виділеної культури.

Якщо акуратно зняти окрему колонію бактеріологічною петлею та внести її в живильне середовище, то можна отримати чисту культуру бактерій. Метод Р. Коха також широко застосовують для кількісного визначення життєздатних клітин у різних лабораторних культурах та природних субстратах. Принцип «одна клітина – одна колонія» дає змогу на основі кількості колоній, що виросли після висівання на тверде живильне середовище певного об'єму досліджуваної суспензії, визначити вихідний вміст клітин мікроорганізмів у культурі, який виражають або кількістю клітин, або в умовних колонієутворюючих одиницях (КУО).

**Метод розведень (метод Пастера)** – передбачає приготування розведеної суспензії мікроорганізмів і висівання її у чашки Петрі на тверде живильне середовище.

На практиці висівання бактерій проводять з таким розрахунком, щоб в одній чашці Петрі діаметром 9 см утворилося не більше 200 колоній. Для цього слід висіяти приблизно 200 бактерійних клітин. Нічна культура бактерій *E. coli* містить приблизно 10<sup>9</sup> клітин в 1 мл. Тому для отримання потрібної густини посіву треба взяти приблизно 0,0002 мкл культури. Оскільки неможливо відібрати такий об'єм рідини і рівномірно розподілити його по всій поверхні середовища, то для отримання потрібної густоти посіву культуру потрібно розвести. Для цього використовують **метод послідовних розведень**, за якого культуру розводять спочатку в 10 разів, а отриману суспензію знову розводять у 10 разів, отримуючи 100-кратне розведення. У такий спосіб готують усі наступні розведення суспензії мікроорганізмів. Не варто розводити культуру більш ніж у 10 разів за один прийом, оскільки під час цього знижується точність розведення. Ступінь розведення залежить від густоти досліджуваної популяції мікроорганізмів, вона є більшою, якщо більшою є густина вихідної бактерійної культури. Зазвичай виконують 6–7 розведень, і

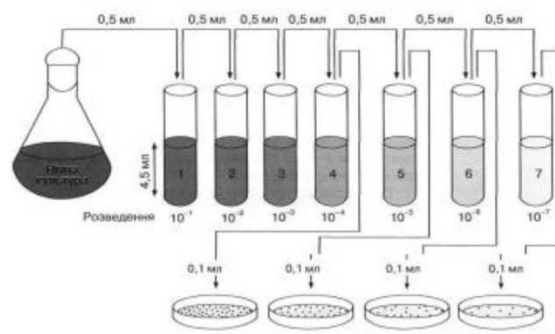


Рис. 27 – Метод послідовних розведень

оскільки точна концентрація бактерій у культурі невідома, то у чашку Петрі висівають суспензії останніх трьох розведень. Висівання у чашку Петрі отриманих розведень бактерійної культури здійснюють як глибинним, так і поверхневим способом. Оскільки бактерії мають обмежену рухливість, потімки однієї бактерійної клітини утворюють компактну колонію, видиму неозброєним оком. За умов розрідженого посіву такі колонії не контактуватимуть між собою.

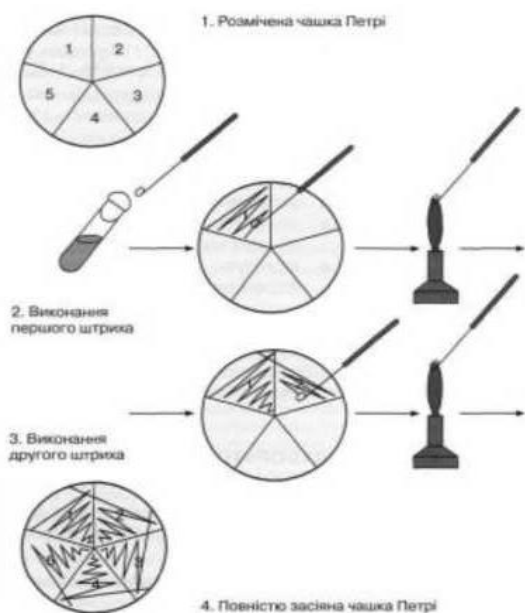


Рис. 28 – Метод «виснаженого» штриха

Для одержання окремих клонів бактерій часто застосовують інший прийом – метод «виснаженого» штриха. Метод «виснаженого» штриха ґрунтується на поступовому зменшенні густоти посіву шляхом розтирання суспензії мікроорганізмів по поверхні твердого середовища.

Процес виділення чистої культури закінчують пересіванням ізольовано вирощеної колонії у пробірку з відповідним живильним середовищем. Для подальшої роботи отримані штами бактерій аналізують та зберігають. Для цього досліджують як індивідуальні ознаки клітин мікроорганізмів (форму та розмір клітин, особливості будови і функції їх органел), так і ознаки клонів (форму, розмір, особливості поверхні та забарвлення колоній, здатність культури засвоювати певні джерела живлення тощо).

Критерієм чистоти отриманої культури є однорідність клітин під мікроскопом, однотипність колоній у чашці Петрі під час подальшого пересівання на живильне середовище, придатне для її росту. Кожна колонія складається із клітин одного виду, однак для виділення чистої культури необхідно пересіяти колонію на окреме середовище, тобто ізолювати її від мікроорганізмів інших видів.

Колонії більшості бактерійних штамів можна зберігати впродовж кількох тижнів на поверхні агаризованого середовища, якщо чашки Петрі ретельно заклеїти парафіномом і тримати за температури 4 °С. Щоб подовжити термін зберігання культури до 1–2 років, використовують стовпчики з 0,6–0,7 % агаризованого багатого середовища. Бактерії вносять у них стерильною мікробіологічною голкою, інкубують за потрібної температури протягом ночі, ретельно закупорюють стовпчик із культурою, щоб живильне середовище не підсихало, і зберігають у темряві за кімнатної температури або за 4 °С. До того ж бактерійні культури можна зберігати протягом багатьох років за –70 °С у рідкому середовищі, що містить розчин 15 % гліцерину.

**Метод Дригальського, або метод пластинчатого посіву.** Беруть 4–5 стерильних чашок Петрі. Агарове середовище в колбі розплавляють на водяній бані, після цього, вийнявши пробку, злегка прогривають краї колби, і агар розливають у чашки Петрі рівномірним шаром. Закриті кришкою чашки Петрі залишають на столі. Після ущільнення середовища чашки ставлять у термостат для підсушування вверх дном

на 3–4 год за 37–38 °С. Краплю матеріалу, що досліджується, бактеріологічною петлею вносять на поверхню агару, шпателем Дригальського розтирають рівномірно по поверхні середовища. Цим самим шпателем, не опалюючи його, розтирають (засівають) по поверхні середовища другої чашки, після цього послідовно у третій, четвертій чашках. Після посіву їх розміщують у термостаті вверх дном. Зростання ізольованих колоній досягається в останніх чашках. Далі потрібну колонію відзначають, відсівають в МПБ і МПА, ставлять у термостат для вирощування.

Для отримання чистих культур використовують і інші методи: нагрівання, додавання до живильних середовищ (або до матеріалу, що досліджується) хімічних речовин, біологічний метод (зараження лабораторних тварин). У разі необхідності відділення спорових форм від видів, які не утворюють спори, готують суспензію матеріалу, що досліджується, прогрівають її на водяній бані за 80 °С 30–40 хв – вегетативні форми мікроорганізмів гинуть, спори зберігаються життєздатними. Далі прогріту суспензію висівають методом Дригальського.

Наведені методи отримання окремих колоній широко застосовують для:

- кількісного обліку мікроорганізмів;
- отримання нових штамів мікроорганізмів;
- контролю генетичної однорідності та якості штаму продуцента;
- контролю звичайного та перехресного забруднення штаму-продуцента;
- контролю виникнення спонтанних мутацій у промисловій культурі (особливо у тих культурах, що мають селективну перевагу над штамом-продуцентом і внаслідок цього можуть витіснити його з промислової культури).

Під час роботи з чистою культурою важливо не допустити її забруднення іншими мікроорганізмами. Щоб не заразити чисті культури сторонніми мікроорганізмами, під час виготовлення препаратів і пересівів необхідно дотримуватися такої послідовності дій:

1. Запалити газовий пальник (спиртівку).
2. Пробірку з культурою взяти в ліву руку так, щоб було видно поверхню середовища з нальотом мікроорганізмів.
3. У праву руку взяти бактеріологічну петлю і прожарити її у верхній частині полум'я пальника. Металеву частину тримача повільно провести через вогонь два-три рази.
4. Не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцем правої руки притиснути ватну пробку до долоні, витягнути її з пробірки і тримати, не торкаючись оточуючих предметів.
5. Край відкритої пробірки провести через полум'я пальника.
6. Ввести у пробірку стерильну петлю, охолодити її, торкаючись поверхні агару, а далі взяти петлею невелику кількість мікробної маси.

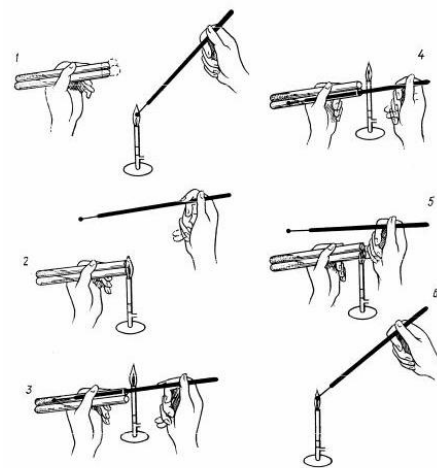


Рис. 29 – Пересів культури мікроорганізму

*7. Шийку пробірки і ватну пробку одночасно провести через верхню частину полум'я пальника і закрити пробірку пробкою.*

*8. Пробірку поставити в штатив, а відібрану петлею бактеріальну масу використати для виготовлення препарату або посіву.*

*9. Залишки бактерій на петлі обпалити в полум'ї пальника.*

Для посіву мікроскопічних грибів у чашку Петрі чашку необхідно перевернути догори дном і в такому вигляді відкрити в межах стерильної зони. Кінчиком гачка, на якому містяться спори, конідії або грибний міцелій, потрібно доторкнутися до центру агарового диску. Чашку Петрі у перевернутому вигляді помістити в термостат і культивувати в такому вигляді з метою запобігання осідання грибних конідій та спор на поверхню агару).

### **Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Що означають терміни «посів» і «пересів» культур мікроорганізмів?
2. Як здійснюється пересів мікроорганізмів з агаризованого на агаризоване середовище у пробірки?
3. Як здійснюється пересів на агаризовані середовища мікроорганізмів, вирощених на рідких середовищах?
4. Які особливості притаманні поверхневому і глибинному посіву мікроорганізмів на агаризовані середовища у чашки Петрі?
5. Що таке чиста культура?
6. Які методи виділення чистих культур ви знаєте?
7. У чому полягає суть методу розбавлення і крапельного методу для виділення чистих культур?
8. Охарактеризуйте метод Коха для виділення чистих культур.
9. У чому полягає суть методу «виснаженого» штриха і «виснаженого» мазка для виділення чистих культур мікроорганізмів?
10. Як здійснюється посів на чашки Петрі до «ізолюваних колоній»?

## Лабораторна робота 10.

### Колекції чистих культур. Методи виділення та підтримки

**Основні відомості.** Колекції культур мікроорганізмів використовуються для аутентифікації, вироблення, збереження, каталогізації та розподілу життєздатних культур стандартних еталонних мікроорганізмів, клітинних ліній та інших матеріалів для досліджень і систематики. Музейні колекції культур також є сховищами клітинних ліній мікроорганізмів. Колекції мікроорганізмів та грибів зберігаються у провідних наукових установах країн. Відповідні відділи цих установ повинні отримувати всі зразки штамів для депонування. За цих умов видається відповідне посвідчення, що засвідчує прийняття штаму або культури на зберігання та посвідчує їх унікальність. Найбільшими колекціями мікроорганізмів та грибів є Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України та Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України.

Інститут мікробіології і вірусології є провідним в Україні науково-дослідним центром, який проводить дослідження в галузі класичної мікробіології, вірусології та мікробної біотехнології. Інститут з початку свого створення почав формувати колекцію непатогенних мікроорганізмів – Українську колекцію мікроорганізмів (УКМ, UCM). Основними завданнями УКМ є підтримання та поповнення мікробного фонду з метою збереження біологічного та функціонального різноманіття, вивчення сучасного таксономічного стану колекційних штамів мікроорганізмів та їх біотехнологічного потенціалу, забезпечення науково-виробничих установ промисловими та фармакопейними штамми різного призначення. Сьогодні УКМ є найбільшою в Україні колекцією непатогенних штамів мікроорганізмів з офіційним державним статусом. Промислово цінні патентні штамми мікроорганізмів підтримуються в Депозитарії ІМВ НАНУ, який є єдиним в Україні депозитарієм, що забезпечує гарантоване державне зберігання непатогенних інноваційних мікроорганізмів. УКМ присвоєно статус «Об'єкт Національного надбання України» (Постанова КМУ від 1 квітня 1999 р. № 527) та зареєстровано у Всесвітньому центрі даних про мікроорганізми. УКМ зберігає унікальні штамми, що належать до різних таксономічних груп мікроорганізмів, виділених в Україні, а також типові штамми, отримані з міжнародно визнаних зарубіжних колекцій. Мікробні фонди УКМ містять більше ніж 5 600 культур мікроорганізмів, які представлені понад 1 000 видів та 300 родів. У колекції зберігається понад 300 типових штамів різних видів, зокрема представники видів, вперше описаних дослідниками ІМВ НАНУ (зокрема деякі види спороутворювальних, метилотрофних, морських грамнегативних бактерій та актинобактерій). Сьогодні колекційний фонд УКМ налічує понад 3 500 штамів бактерій, 1 100 штамів мікроскопічних грибів і 1 000 штамів дріжджів. Мікробний фонд колекції є джерелом збереження біорізноманіття природних штамів мікроорганізмів, слугує основою для фундаментальних досліджень з біохімії, екології, фізіології та генетики мікроорганізмів, а також удосконаленню їх класифікації та опису нових таксонів. Серед колекційних культур є унікальні, ізольовані та підтримувані лише в УКМ пробіотичні штамми; штамми-продуценти ферментів, антибіотиків, полісахаридів, антиоксидантів та інших біологічно активних речовин; стимулятори росту рослин і штамми, здатні до біодеградації широкого спектру стійких органічних забруднювачів навколишнього середовища. На основі цих штамів проводяться розробки новітніх біотехнологічних препаратів для сільського господарства, медицини, ветеринарії та охорони довкілля.

Колекція культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України заснована у 1966 р. для проведення досліджень з глибинного культивування їстівних макроміцетів. Вона є унікальною, спеціалізованою за складом представлених у ній грибних організмів, виділених із природних екосистем. Нині в Колекції підтримується понад 1 100 штамів 191 виду, що належать до 89 родів грибів відділів Basidiomycota та Ascomycota (Бухало та ін., 2011). У Колекції зберігаються дикаріотичні штами базидієвих і сумчастих макроміцетів різних таксономічних та екологічних груп грибів широкого географічного походження, які представляють насамперед різноманіття мікобіоти України. У Колекції ІВК зберігається велика кількість штамів таких широко культивованих у світі видів їстівних грибів: *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. та інших. Сьогодні Колекція ІВК є найбільшою офіційною спеціалізованою колекцією культур макроміцетів в Україні і однією з найбільших за кількістю видів та штамів у Європі. За постановою Кабінету Міністрів України від 19 грудня 2001 р. № 1709 Колекція культур шапинкових грибів Інституту ботаніки була внесена до реєстру наукових об'єктів, що становлять Національне надбання України. Колекція шапинкових грибів – важливий ресурс розвитку вітчизняного промислового грибовництва та біотехнологій отримання дієтичних лікувально-профілактичних харчових додатків, функціональних продуктів, біологічно активних речовин.

**Мета роботи:** ознайомитися з правилами та методами створення, збереження та використання колекцій мікроорганізмів та грибів.

**Перебіг роботи.** Колекції мікроорганізмів та грибів поділяють на виробничі та лабораторні.

**Виробничі колекції** – власне штами, що використовують для промислового виробництва, наприклад, біопрепаратів. Зусилля селекції спрямовані саме на отримання високопродуктивних виробничих штамів, що мають високу комерційну цінність. Часто такі штами мають здатність надсинтезу – тобто виробляють певні сполуки більшою мірою, ніж це їм потрібно. До виробничих штамів висуваються такі вимоги:

- *здатність рости на доступних та дешевих поживних середовищах;*
- *висока швидкість росту та вироблення цінних продуктів;*
- *максимальний синтез корисних речовин та мінімальний – домішок;*
- *стабільність генотипу та фенотипу;*
- *стійкість до бактеріофагів та сторонньої мікрофлори;*
- *безпечність для людини та довкілля, відсутність токсичних метаболітів;*
- *економічна доцільність технології виробництва продукту;*
- *бажана ацидофільність, термофільність для зниження вірогідності контамінації (потрапляння в певне середовище будь-якого домішку, який змінює властивості цього середовища).*

**Еталонний штам** – конкретний колекційний зразок певного виду мікроорганізмів або грибів, у якого вивчені морфологічні, фізіологічні, серологічні, культуральні, біохімічні, молекулярно-генетичні та інші особливості. Тобто еталонні штами є паспортизованими і зберігаються в колекціях непатогенних мікроорганізмів наукових установ – депозитаріях.

**Лабораторні колекції** – колекції, наявні в наукових лабораторіях і лабораторіях навчальних установ, що використовуються з метою проведення досліджень

у галузі мікробіології та вірусології, біотехнології та біобезпеки, екології, систематики нижчих рослин, фізіології та біохімії мікроорганізмів та грибів, генетики тощо. В лабораторних колекціях наявні колекції культур шапинкових грибів – грибні організми виділені з природних екосистем, які створюють задля інтродукції в культуру і збереження рідкісних та внесених до Червоної книги України видів макроміцетів та колекції мікроміцетів.



Рис. 30 – колекції грибів  
А – мікроміцети, Б – макроміцети

Такі колекції дають можливість оволодіти навичками роботи з ними, вивчити їх морфологію, культуральні, фізіологічні та біохімічні властивості, а також проводити дослідження в галузі екології мікроорганізмів і біотехнології.

**Порядок умов та обліку зберігання тест-штамів мікроорганізмів у визначених колекціях мікроорганізмів.** Тест-штами мікроорганізмів можуть зберігатися в ліофілізованому, замороженому вигляді та на щільних чи рідких поживних середовищах. Пробірки та ампули із тест-штамами мікроорганізмів повинні мати чітке маркування, яке дає змогу ідентифікувати тест-штам, із зазначенням назви, номера тест-штаму мікроорганізму і дати його пересіву чи ліофілізації. Тест-штами мікроорганізмів слід зберігати в холодильнику або у вогнетривкій шафі (сейфі) в контейнерах. Ззовні чи зсередини шафи (сейфу) та холодильника розміщують список із переліком тест-штамів мікроорганізмів, що зберігаються. Повинні бути вжиті необхідні технічні й організаційні заходи для постійного дотримання необхідних умов зберігання тест-штамів та контролю за цими умовами.

Відповідальність за додержанням умов зберігання тест-штамів мікроорганізмів покладають на кваліфікованого спеціаліста, спеціально призначеного для цього наказом по організації / установі.

Тест-штами мікроорганізмів, які зберігаються в колекціях, підлягають реєстрації і повинні мати реєстраційний номер із зазначенням повної його назви.

Працівники колекції ведуть облік відпуску тест-штамів мікроорганізмів у журналах. Усі журнали повинні бути пронумеровані, прошнуровані та скріплені печаткою організації, в підпорядкуванні якої знаходиться визначена колекція, та зберігатися в осіб, відповідальних за зберігання тест-штамів мікроорганізмів.

### Питання для контролю знань та самопідготовки

1. Що таке штам, еталонний штам?
2. Лабораторні та виробничі колекції мікроорганізмів та грибів.
3. Особливості та умови зберігання колекцій мікроорганізмів та грибів.

## Лабораторна робота 11. Методи інокуляції. Отримання культур грибів

**Основні відомості.** Процес введення живих мікроорганізмів у живильне середовище називається **інокуляцією**. Чисті культури грибів можуть бути виділені з плодових тіл, пророщуванням базидіоспор, з коренів мікоризоформуєчих рослин або з ґрунту, деревини та інших субстратів, які є середовищем існування цих грибів. Найбільш простий та зручний спосіб отримання культур вищих базидіальних грибів – виділення культур з плодових тіл або базидіоспор, якщо вони легко проростають.

Під час вирощування в чистій культурі міцелію вищих базидіальних грибів зазвичай очікують отримання штамів, що характеризуються швидким та яскравим ростом міцелію з високим вмістом білка або ж біологічно активних речовин, незалежно від якості плодоношення цих штамів.

Для виділення культури необхідно обирати молоді, непошкоджені плодові тіла, оскільки вони менш інфіковані мікроорганізмами. Виділення можна проводити в день збору або зберігати плодові тіла протягом 2–3 днів у холодильнику в поліетиленових пакетах.

**Мета роботи:** опанувати методи виділення та вирощування міцелію грибів за допомогою поверхневого та глибинного культивування.

**Перебіг роботи.** Культивування міцелію грибів може здійснюватися методами поверхневого культивування на твердих живильних середовищах або методом глибинного культивування на рідких живильних середовищах. Вибір методу залежить від біологічних особливостей культивованого гриба та завдань роботи.

**Поверхнєве культивування міцеліальних культур на щільних середовищах.** Методи поверхневого культивування полягають у вирощуванні грибів:

- на щільних неагаризованих середовищах;
- на насінні злакових рослин, висівках, деревних стружках або тирсі;
- на стандартних щільних середовищах, розлитих у пробірки, чашки Петрі, кювети тощо;
- на рідких поживних середовищах, розлитих у колби, флакони різної ємності.

Техніка посіву залежить від консистенції живильного середовища, якості матеріалу і мети дослідження. Під час посіву з пробірки в пробірку на тверді і рідкі середовища обидві пробірки (з культурою гриба і стерильну з живильним середовищем) беруть у ліву руку на долоню паралельно до розташування пальців і притримують великим пальцем так, щоб скошена поверхня середовища була добре видна. У праву руку (як олівець) беруть мікологічний гачок і кілька разів проводять його над полум'ям пальника для стерилізації, далі мізинцем і безіменним пальцем правої руки виймають пробку з пробірки і обережно вводять гачок у живильне середовище по стінці пробірки для повного охолодження. Після цього гачок переносять у пробірку з культурою і рухом від себе беруть на його кінець невелику кількість культури в вигляді конідій або шматочка міцелію і переносять у вільне живильне середовище. Краї пробірок і пробки проводять через полум'я пальника і щільно закривають. На пробірці з посівом роблять необхідні написи

склографом або прикріплюють етикетку гумовим кільцем, поміщають їх у металеві або картонні коробки вертикально і переносять у термостатну кімнату для вирощування.

Під час пересіву з твердого живильного середовища на рідке гачок із конідіями або міцелієм занурюють у живильне середовище і злегка струшують; інші процеси ідентичні описаним вище.

Під час пересіву з рідкого живильного середовища на рідке з плівки на поверхні середовища обережно знімають гачком шматочок міцелію або невелику кількість конідій і переносять у глибину стерильного живильного середовища або на його поверхню.

Посів гриба з пробірки в чашку Петрі проводять:

а) на поверхню застиглого живильного середовища;

б) у стерильну чашку без середовища, якщо засівають матеріал у розплавлене та охолоджене до 45–46 °С агаризоване середовище.

У першому випадку стерильну чашку Петрі приміщують на стіл поблизу полум'я газового пальника, обережно відкривають кришку пальцями лівої руки, вносять правою рукою 15–20 мл розплавленого агаризованого середовища і опускають кришку. Після застигання середовища (а в разі необхідності – його підсушування) на поверхню середовища засівають культуру гриба. Кришку чашки під час роботи не знімають, а тільки злегка піднімають, запобігаючи цим забрудненню середовища сторонньою мікрофлорою. Щоб уникнути розсіювання спор по всій поверхні чашки, коли необхідно отримати проростання у вигляді окремих колоній, рекомендується перед посівом чашку із середовищем перевернути кришкою вниз, обережно підняти вгору дно чашки і уколом знизу зробити посів в центр чашки. Після посіву обережно опускають дно чашки на кришку і в такому положенні переносять у термостат, попередньо зробивши позначку на дні чашки про вид культури і дату посіву.

**Культивування на щільних неагаризованих середовищах.** Насіння злакових рослин, висівки, вівсяна крупа, овочі (картопля, буряк) та інші природні продукти є прекрасним живильним субстратом для вирощування грибів, що дає змогу створити оптимальні умови для їх росту. Насіння рису, сорго, арахісу, пшениці, проса, подрібненої кукурудзи в кількості 10–100 г приміщують у пробірки, колби, матраци і зволожують водою (кількість води залежить від виду насіння). На 50 г насіння арахісу додають 12 мл води, на таку ж наважку сорго, пшениці, рису – 15, кукурудзи – 36, соєвих бобів – 18 мл.

Для вирощування міцеліальних культур базидіоміцетів на зерні пшениці та вівса до 100 г насіння пшениці та вівса додають 50 мл води і залишають у колбах Ерленмеєра ємністю 250 мл за кімнатної температури на ніч для набухання. Вміст колб стерилізують 20 хв (121 °С), охолоджують і засівають чистою культурою ксилотрофного базидіоміцету *Pleurotus ostreatus* (міцелій переносять із пробірки, яка містить семиденні культури, вирощені на сушло-агарі за 27 °С). Після інокуляції культуру вирощують у термостаті протягом 10 діб. Кожні 24–28 год у колби додають стерильну воду з розрахунку 1 мл на 25 г зерна. На 11 добу культивування, або коли буде спостерігатися повне заростання субстрату, матеріал переносять у приміщення зі зниженою до 18–20 °С температурою та освітленням, наближеним

за спектром та періодичністю до денного. Чекають 12–15 діб до появи зрілих пло- дових тіл гливи звичайної. Вимірюють кількість плодових тіл та їх масу. Вирахо- вують співвідношення маси карпофорів та субстрату, на якому вони були вирощені.

**Культивування міцелію базидіоміцетів на щільних агаризованих сере- довищах.** Для культивування грибів готують одне з наведених нижче твердих живильних середовищ, рекомендованих для вирощування міцелію базидіальних грибів.

*Приготування картопляно-глюкозного агару.* У колбу ємністю 500 мл примі- шують 63 г очищеної, дрібно порізаної картоплі та 300 мл води. Картоплю варять протягом 15 хв, після чого виймають із колби, до відвару додають 2,5 г глюкози та 2,3 г агар-агару. Розчинення агар-агару відбувається на електричній плиті за умов постійного помішування. Після повного розчинення агар-агару об'єм вмісту колби доводять до 250 мл. Живильне середовище розливається в чашки Петрі або пробірки та стерилізується в автоклаві за 1,2–1,5 атм протягом 40 хв.

*Приготування агаризованого мінерального середовища Чапека.* Для приго- тування 250 мл середовища в колбу на 1 л наливають 150 мл дистильованої води та додають по чергово, після повного розчинення попереднього компонента, такі елементи (г): сахароза – 7,  $\text{NaNO}_3$  – 0,5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,25,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,13,  $\text{KCl}$  – 0,13,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0025, агар-агар – 4. Розчинення агар-агару відбувається на електричній плиті за умови постійного помішування. Об'єм рідини в колбі дово- дять дистильованою водою до 250 мл. Живильне середовище розливають у чашки Петрі, пробірки та стерилізують в автоклаві за 1,2–1,5 атм протягом 40 хв.

*Приготування сусло-агару.* Для приготування 250 мл середовища в колбу на 500 мл наливають 250 мл 25 % пивного неохміленого сусла та додають 5 г агар- агару. Розчинення агар-агару відбувається на електричній плиті за умови постій- ного помішування. Об'єм рідини в колбі доводять дистильованою водою до 250 мл. Живильне середовище розливають у чашки Петрі, пробірки та стерилізують у автоклаві за 1,2–1,5 атм протягом 40 хв.

Досліджуваний гриб висівають у центр поверхні щільного живильного сере- довища та культивують у термостаті за температури 27 °С. Для аналізу росту культури гриба вимірюють діаметр колонії у двох взаємно перпендикулярних напрямках у двох-трьох повторюваннях кожної доби. Кількість вимірювань за- лежить від швидкості росту гриба. Результати вимірювань – середній добовий приріст – використовують для опису культуральних особливостей досліджуваного виду або штаму.

**Культивування міцеліальних культур на рідких живильних середовищах.** На рідких живильних середовищах біотехнологічне культивування штамів може проходити як поверхневим, так і глибинним методами. Під час глибинного ме- тоду культивування міцелій занурений у рідке живильне середовище, яке аерується, на весь період ферментації. Глибина занурення різна (0–10 мм) і залежить від масообміну, що викликається аерацією, конструкції мішалки та інших факторів. Глибинне культивування має низку переваг, порівняно з поверхневим:

- для міцелію, що росте в товщі живильного середовища, створюються однакові умови (хімічні, фізичні);

- механічне перемішування середовища і безперервна аерація сприяють зростанню міцелію і накопиченню продуктів обміну, оскільки у таких культурах розчинення і швидкість дифузії кисню вища, ніж у стаціонарних;

- скорочується термін ферментації і збільшується кількість одержуваного продукту завдяки збільшенню обсягу рідини і застосуванню ферментерів різного типу, що дають змогу регулювати ферментаційний процес.

Глибинний метод більш економний, але вимагає спеціального дорогого устаткування, певних штамів-продуцентів, спеціальної сировини, великої кількості стерильного повітря.

**Поверхнєве культивування ксилотрофних базидіоміцетів на рідких живильних середовищах.** Для поверхневого культивування культур ксилотрофів найчастіше використовують глюкозо-пептонне живильне середовище.

*Приготування глюкозо-пептонного середовища.* Для приготування ГПС об'ємом 1 л у дистильовану воду додають: глюкоза – 10 г, пептон – 3 г,  $K_2HPO_4$  – 0,4 г,  $KH_2PO_4$  – 0,6 г,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5 г,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,01,  $CaCl_2$  – 0,05 г. Кислотність середовища доводять до значення 6,5 рН за допомогою 10 % розчину луку або кислоти. Для приготування рідкого середовища із кукурудзяним крохмалем на 1 л середовища додають компоненти за наведеним вище рецептом та 10 г кукурудзяного крохмалю. Кислотність середовища доводиться до значення 6,5 рН за допомогою 10 % розчину луку або кислоти. Об'єм середовища доводять до 1 л дистильованою водою.

Приготовлене живильне середовище розливають по 50 мл у колби Ерленмеєра об'ємом 100 або 250 мл, стерилізують у автоклаві за 1,2–1,5 атм протягом 40 хв.

Інокулюють середовище шматочками міцелію досліджуваного штаму ксилотрофного базидіоміцету та культивують його, приміщуючи колби у термостаті за температури 27 °С. На 9 та 12 добу культивування перевіряють ріст міцелію. Для цього беруть 3 проби кожного досліду і визначають сиру та абсолютну суху біомасу культури (отримується шляхом висушування промитого міцелію у сушильній шафі за температури 110 °С). Перераховують вихід абсолютно сухої біомаси досліджуваного базидіоміцета на 1 л середовища і роблять висновок щодо ефективності його культивування на різних середовищах.

### Питання для контролю знань та самопідготовки

1. Дайте визначення різним варіантам поверхневого культивування.
2. Які живильні середовища підходять для поверхневого культивування?
3. Що таке глибинне культивування? Які середовища підходять для такого типу культивування?
4. У чому переваги та недоліки глибинного культивування?
5. Дайте визначення поняття «інокуляція».

## Лабораторна робота 12. Визначення молокозсідальної (сичужної) активності

**Основні відомості.** У якості продуцентів ферментів використовують культури представників різних таксономічних груп – бактерій, актиноміцетів, мікроскопичних та вищих базидіальних грибів. До таких організмів, що є продуцентами ферментів, ставиться низка вимог. Зокрема це:

- наявність високої ферментативної активності;
- переважний синтез ферменту або групи ферментів, що перетворюють певний субстрат;
- генетична стабільність за ознакою синтезу ферменту або ферментів;
- достатньо висока швидкість росту;
- здатність рости на середовищах із доступними і недорогими джерелами живлення.

Серед організмів, що мають високу активність певного ферменту, перевага віддається тим, які в оптимальних фізіологічних умовах здатні синтезувати переважно один фермент або групу споріднених ферментів. Здатність до активного синтезу одного або групи близьких ферментів властива тим організмам, у яких біосинтез різко посилюється в присутності індукторів, у якості яких найчастіше виступають субстрати ферментів або продукти їх неповного розщеплення.

Культивування продуцентів ферментів проводять в умовах стерильності (глибинний процес) або максимально можливого наближення до них (поверхневий твердофазний процес). Збереження чистоти культури не менш важливе, ніж генетична стабільність продуцента.

Забезпечення стерильності полегшується під час нетривалого культивування продуцента і наявності у нього природних механізмів захисту від інфекції. Стабільність рівня біосинтезу ферментів вища у мікроорганізмів, здатних розвиватися в широкому діапазоні зміни зовнішніх факторів, як-от концентрація джерел живлення, реакція середовища, рівень аерації та ін. Спираючись на економічні міркування, доцільно використовувати доступні і недорогі джерела живлення.

Переважним способом культивування мікроорганізмів є глибинний, заснований на вирощуванні продуцентів у стерильних рідких середовищах з примусовою аерацією (для аеробних форм). Поряд із глибинним застосовується поверхневий спосіб культивування, коли культури продуцентів вирощують на поверхні рідких і сипучих (твердофазне культивування) живильних середовищ (висівки, буряковий жом, подрібнена целюлозовмісна сировина, солодові паростки та ін.). Останні звожують і стерилізують.

**Реннін (протеаза)** – молокозсідальний сичужний фермент, який використовують під час виробництва сиру для зсідання молока. Виробництво ферменту лімітується рівнем розвитку тваринництва і вимагає пошуку нових нетрадиційних продуцентів. Отримання цінних грибних метаболітів пов'язано з підбором умов для їх синтезу під час культивування і є одним із головних завдань біотехнології.

**Принцип методу.** Метод заснований на визначенні часу, за який відбувається зсідання молока. Субстратом для визначення сичужної активності є свіже натуральне молоко або 12 % розчин сухого молока з додаванням  $10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1 мл 15 % розчину  $\text{CaCl}_2$  на 100 мл молока), рН субстрату доводять соляною кислотою до 6,0.

**Мета роботи:** оволодіти методами оцінки якості ферментних препаратів культивованих мікроорганізмів та грибів на прикладі визначення молокозсідальної активності.

**Матеріали та обладнання:** водяна баня термостатована, секундомір, пробірки, магнітна мішалка, культури грибів-продуцентів різного віку, молоко незбиране або 12 % розчин сухого молока, хлорид кальцію ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 15 % розчин, соляна кислота ( $\text{HCl}$ ) 15 % розчин.

**Перебіг роботи.** У 3 пробірки вносять по 10 мл субстрату і розміщують на водяну баню за 35 °С (виміри також можуть проводитися за інших температур: 30, 35, 40, 45, що дає змогу встановити термостабільність ферментного препарату). Через 1–2 хв у дослідні пробірки вносять 1 мл 0,1 % розчину ферменту (відношення фермент–субстрат 1 : 10), а в контрольну пробірку 1 мл кип'яченого розчину ферменту. Суміш струшують і розміщують на баню за відповідної температури. Під час струшування пускають секундомір і починають відлік часу зсідання молока, яке закінчується під час появи у пробірках щільного згустку. Час, за який утворюється згусток, умовно вважають молокозсідальною активністю (МЗА), у хвилинах. За одиницю прийнята кількість ферменту, за допомогою якого зсідается 100 мл молока за 40 хв за 35 °С (стандартна швидкість зсідання молока за умови використання сичужного ферменту, отриманого з тканин шлунку телят). Розрахунок ведуть за такою формулою:

$$\text{МЗА} = \frac{40 \times 100 \times K}{t \times n},$$

де:

**МЗА** – молокозсідальна активність препарату, од/г;

**K** – коефіцієнт розведення препарату ферменту;

**t** – час зсідання молока, хв;

**40** – середній час зсідання молока під час виробництва сиру, хв;

**n** – наважка ферментного препарату, г.

### Питання для контролю знань та самопідготовки

1. Наведіть принцип методу визначення молокозсідальної активності. До якого класу належить цей фермент?
2. Охарактеризуйте метод визначення активності ферменту та послідовність виконання аналізу.
3. Для яких груп живих організмів характерна наявність молокозсідальної активності? Яке значення мають ці ферменти у життєдіяльності?
4. Як використовуються ферменти молокозсідальної дії у практичній діяльності людини?
5. Який фермент молокозсідальної дії використовується під час виготовлення сирів?
6. Чим можна замінити сичужні ферменти тваринного походження?
7. Які переваги може мати використання протеолітичних сичужних ферментів, що продукуються вищими грибами?

### Лабораторна робота 13. Мікроклональне розмноження рослин живцями

**Основні відомості.** Мікроклональне розмноження – це безстатеве вегетативне розмноження в культурі *in vitro*, під час якого отримують рослини, генетично ідентичні вихідній батьківській формі, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу. Воно має низку переваг, порівняно з традиційними методами розмноження рослин:

- економія вихідного матеріалу;
- отримання великої кількості копій із мінімальної кількості рослинного матеріалу;
- отримання генетично однорідного матеріалу;
- можливість відбирати *in vitro* рослинний матеріал з бажаними ознаками;
- можливість отримання безвірусного матеріалу;
- можливість розмножувати рослини впродовж року, оскільки їх ріст і розвиток *in vitro* практично не залежать від сезону;
- можливість отримувати у великих кількостях вегетативне потомство видів рослин, що важко розмножуються у звичайних умовах;
- економія площі для вирощування;
- можливість тривалого збереження пробірочних рослин за понижених температур, що дає змогу створити банк цінних форм рослин.



Рис. 31 – Молоді асептичні рослини роду *Lithops Lithops*, що культивуються в умовах *in vitro*

Сьогодні розроблено різні способи біотехнології мікроклонального розмноження. У їх основі лежать чотири принципові підходи:

- активація розвитку рослинних меристем (апекс пагону, пазушні та сплячі бруньки пагону);
- утворення адвентивних бруньок із тканин експланта;
- індукція соматичного ембріогенезу;
- диференціація адвентивних бруньок у первинній та перевивній калюсній тканині.

Основним методом мікроклонального розмноження рослин є активація пазушних меристем, яка базується на знятті апікального домінування.

Інший метод – це індукція виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантата.

У певних випадках ефективним методом розмноження рослин *in vitro* є соматичний ембріогенез.

Основними факторами, що впливають на процес мікроклонального розмноження, є тип експлантата, склад живильного середовища та умови культивування.

Як вихідний матеріал для мікроклонального розмноження можна використовувати верхівкові та пазушні меристеми стебла, молоді листки, елементи суцвіття та квітки, цибулини і бульбоцибулини. Ідеальним матеріалом для отримання

численних пагонів є апікальні та пазушні бруньки здорових рослин і тих, що активно ростуть.

У більшості випадків для мікроклонального розмноження рослин *in vitro* використовують різні модифікації середовища Мурасиге і Скуга.

**Мета роботи:** оволодіти методикою вегетативного розмноження рослин *in vitro*, що базується на активації пазушних меристем.

**Матеріали, реактиви, обладнання:** асептичні рослини картоплі, гвоздики або тютюну, стерильне середовище МС (у пробірках для рослин картоплі та гвоздики або баночках для рослин тютюну), стерильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, спирт, спиртівка, ламінар-бокс.

**Перебіг роботи.** Пробірку з рослиною протерти спиртом і обпалити горло у полум'ї спиртівки. Стерильним пінцетом дістати рослину-регенерант із пробірки, в якій вона росла, і помістити її у стерильну чашку Петрі. Підтримуючи рослину пінцетом, скальпелем порізати стебло на сегменти завдовжки приблизно 10 мм, щоб частина над брунькою становила 2–3 мм, а під нею – 5–7 мм. Обрізати листки. Пінцетом перенести кожний сегмент у пробірку з живильним середовищем МС. Пазуха листка має бути над середовищем.

Культивування проводять за температури 25–28 °С, освітлення 2–3 клк, 16-годинного фотоперіоду, відносної вологості повітря 70–75 %.

За 3–4 тижні з пазушних бруньок розвиваються рослини-регенеранти, які знову можна використати для розмноження живцюванням та отримання калусної тканини, ізольованих протопластів тощо.

### Питання для контролю знань та самопідготовки

1. Що таке мікроклональне розмноження?
2. Назвіть основні переваги мікроклонального розмноження над традиційним.
3. Від яких факторів залежить здатність рослинної клітини реалізувати властиву їй тотипотентність?
4. Назвіть методи мікроклонального розмноження.
5. Назвіть етапи мікроклонального розмноження рослин.

## Лабораторна робота 14. Отримання первинного калюсу

**Основні відомості.** Основним типом рослинної культури *in vitro* є калюсна. Вона використовується як вихідний матеріал для отримання суспензійної культури, ізольованих протопластів, сполук вторинного синтезу, проведення клітинної селекції для отримання нових форм рослин тощо.

У відповідь на поранення паренхімні клітини дедиференціюються, переходять до проліферації, внаслідок чого утворюється первинна калюсна тканина. Утворення та ріст калюсу регулюються певним співвідношенням ауксинів і цитокінінів. За допомогою цих речовин можна індукувати утворення калюсу тими тканинами рослини, які його не утворюють у разі поранення.

Для отримання калюсу використовують середовища Уайта, Мурасиге і Скута, Гамборга та інші, доповнені регуляторами росту. Для індукції калюсоутворення слід використовувати живильні середовища з високим співвідношенням ауксину і цитокініну (10:1). Утворення калюсу залежить також від розмірів експланта. Розмір первинного експланта 5–10 мм<sup>3</sup>, а маса – 20–100 мг.

**Мета роботи:** отримати калюсну тканину з експлантатів листкового, стеблового, черешкового і міжвузлового походження; порівняти частоту калюсоутворення на експлантатах різного походження.

**Матеріали, реактиви, обладнання:** асептичні рослини картоплі, гвоздики або тютюну; чашки Петрі зі стерильним середовищем для калюсу, стерильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, леза, спирт, спиртівка, ламінар-бокс, парафілм.

**Перебіг роботи.** Стерильним пінцетом дістають рослину із пробірки (картопля, гвоздика) або баночки (тютюн) і помістити у стерильну чашку Петрі. Підтримуючи рослину пінцетом, скальпелем розрізають її на експлантати (5–10 мм):



Рис. 33 – Калюс тютюну  
*Nicotiana tabacum*

- стебло;
- міжвузля;
- листок;
- черешок.

На листках роблять додаткові надрізи. Експлантати приміщують у чашки Петрі з калюсогенним середовищем. Закривають чашки та підписують їх.

Чашки Петрі з рослинним матеріалом культивують у термостаті за температури 25±1 °С. За 25–30 діб візуально визначають частоту калюсоутворення на експлантатах. Результати записують у таблицю 4.



Рис. 32 – Калюсна  
тканина ясеня

**Таблиця 4. Частота калусоутворення на експлантатах різного походження**

Номер досліджу	Тип експлантата	Загальна кількість експлантатів	Кількість експлантатів, що утворили калюс		Індекс росту
			штук	%	

**Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Що таке калюс?
2. Які зміни відбуваються у спеціалізованій клітині під час переходу до дедиференціації?
3. Із яких органів рослини можна отримати калюсну тканину?
4. Які фітогормони індукують утворення калюсної тканини?
5. Чим відрізняються середовища для вирощування рослин від середовищ для вирощування калюсу?

## **Лабораторна робота 15. Отримання первинної калюсної культури**

**Основні відомості.** Первинний калюс – це той, що утворився на експлантах за 4–6 тижнів. Його переносять на свіже живильне середовище – перевивають (субкультивують). Внаслідок цього отримують калюсну тканину, яка має вигляд аморфної маси, що складається з тонкостінних паренхімних клітин без визначеної анатомічної структури. Розмір трансплантата, культивованого на агаровому середовищі, коливається від 60 до 100 мг тканини на 30–40 мл живильного середовища. Калюсну тканину можна підтримувати в культурі необмежено тривалий час, періодично розділяючи її на фрагменти та пересаджуючи на свіже середовище.

**Мета роботи:** наростити калюсну тканину та отримати перевивку культури.

**Матеріали, реактиви, обладнання:** чашки Петрі з експлантами, на яких утворився калюс, чашки Петрі зі стерильним середовищем для калюсу, пінцети, скальпелі, стерильні чашки Петрі, спирт, спиртівка, ламінар-бокс, парафілм.

**Перебіг роботи.** Експлантат з первинним калюсом переносять у стерильну чашку Петрі. Притримуючи експлантат пінцетом, скальпелем зрізають калюс. Скальпелем поділяють калюсну тканину на рівні фрагменти, які переносять на свіже живильне середовище. Підписують чашку Петрі та закривають парафілмом. Чашки культивують у термостаті за  $25 \pm 1$  °C. За 4–6 тижнів від нарості калюсної тканини відокремлюють шматочки агарового середовища, а калюс розділяють на рівні фрагменти, які переносять на свіже живильне середовище для калюсу. Для підтримання калюсної культури цю операцію необхідно проводити кожні 4–6 тижнів. Період субкультивування встановлюють для кожної культури експериментально.

### **Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Назвіть цитолого-морфологічні особливості клітин калюсної тканини.
2. Наведіть приклади можливого використання калюсної тканини.
3. Які фітогормони використовують для росту та диференціації рослинних клітин?
4. Що таке клітинна селекція?
5. Назвіть переваги клітинної селекції над традиційною.
6. Що таке соматоклональна мінливість і де її використовують?

## Лабораторна робота 16.

### Вплив співвідношення ауксин–цитокінін на ріст калюсної тканини та її тип

**Основні відомості.** Залежно від походження та умов вирощування калюсні тканини бувають:

- *пухкими, сильно обводненими, які легко розпадаються на окремі клітини;*
- *середньої щільності, з добре вираженими меристематичними осередками;*
- *щільними (компактними) з зонами редукованого камбію і судин.*

У разі тривалого культивування на живильних середовищах на щільність калюсу впливають ауксини, особливо 2,4-Д: чим вищий вміст 2,4-Д у середовищі, тим пухкіша калюсна тканина. Встановлено, що щільні калюси можуть дати початок пухким тканинам, але не навпаки.

Для визначення росту калюсних тканин насамперед визначають збільшення сирої маси ( $W_t - W_0$ ), де  $W_0$  – початкова маса калюсу,  $W_t$  – кінцева маса калюсу. Результати можуть бути виражені відносно вихідної маси:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0}.$$

Це дає змогу встановити, у скільки разів збільшилася маса впродовж дослідження. Величину приросту маси можна виразити у відсотках:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \text{ \%}.$$

Якщо тривалість росту в окремих випадках неоднакова, необхідно ввести у формулу фактор часу:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times \frac{1}{t}.$$

Так само можна проводити облік результатів за масою сухої речовини.

Зазвичай для оцінки росту калюсу визначення приросту маси сирої і сухої речовини недостатньо. Більше інформації про особливості росту калюсу отримують під час визначення кількості клітин на одиницю маси тканини або на калюс. Підрахунок клітин дає змогу визначити, завдяки чому відбувається збільшення маси тканини: через поділ клітин чи їх ріст. Це дає можливість розрахувати і середню вагу клітини. Кількість клітин визначають за методом Брауна, який полягає у мацерації і наступному підрахунку клітин у краплі суспензії. Використовують кілька методів мацерації, більшість із яких базується на обробці тканин кислотами, котрі гідролізують серединні пластинки, що з'єднують клітини. Клітини підраховують у камері Фукса–Розенталя.

**Мета роботи:** візуально визначити тип калюсної тканини на середовищах з різним співвідношенням ауксин–цитокінін; визначити співвідношення ауксин–цитокінін, яке забезпечує максимальний приріст маси калюсної тканини.

**Матеріали, реактиви, обладнання:** чашки Петрі з калюсом (картоплі, тютюну, сої, топінамбура тощо); маточні розчини макро- та мікросолей МС, Фе-хелату, вітамінів, 2,4-Д, кінетину; інозит, сахароза, агар, 1 N KOH, пеніцилінові флакончики, фольга, склянки, мірний циліндр, мірні піпетки, ваги, рН-метр, автоклав, стерильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, спирт, спиртівка, хромовий ангідрид, пробірки, камера Фукса–Розенталя, мікроскоп.

**Перебіг роботи.** Робота складається з кількох завдань.

**Завдання 1**

Готують 1 л середовища МС з додаванням 3 мг/л 2,4-Д. Розділяють середовище на 10 частин по 100 мл і розливають у пронумеровані склянки. До середовища у кожену склянку додають відповідну кількість кінетику від 0,1 до 1,0 мг/л (0,1, 0,2, 0,3... 1,0 мг/л). Середовище розливають у пеніцилінові флакончики (по 5 мл), закривають фольгою і стерилізують у автоклаві.

**Завдання 2**

У боксі 4–6-тижневу калюсну тканину ділять на рівні фрагменти, які переносять на середовище у пеніцилінові флакончики. 20–30 експлантатів залишають і зважують для встановлення середньої маси експлантата. Флакончики з калюсом культивують у термостаті за температури  $25 \pm 1$  °С. За шість тижнів візуально визначають тип калюсу, після цього кожен шматочок калюсу виймають із флакончика, відокремлюють від нього агар і зважують. Відносний приріст маси калюсної тканини визначають за формулою:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \%$$

де  $\Delta W$  – відносний приріст маси;

$W_0$  – початкова маса калюсу;

$W_t$  – кінцева маса калюсу.

Результати заносять до таблиці 5, будують діаграму.

**Таблиця 5. Вплив співвідношення 2,4-Д–кінетин на приріст маси калюсу**

Номер дослідження	Вміст кінетика в середовищі, мг/л	Середня вага калюсу, мг		Відносний приріст маси калюсу, %	Тип калюсу
		початкова	кінцева		

**Завдання 3**

Готують 100 мл 7,5 % розчину хромового ангідриду. У 30 пробірок наливають по 2 мл розчину хромової кислоти. З кожного варіанта дослідження беруть по три наважки калюсної тканини масою 0,1 г, які приміщують у пробірки з розчином для мацерації. Пробірки ставлять у термостат на 24 год за температури 25 °С. Час інкубації для кожної культури підбирають експериментально.

Перед підрахунком ретельно струшують вміст пробірки, щоб отримати рівномірну суспензію клітин. *Робити це треба дуже акуратно, бо для мацерації використовують кислоту.*

Якщо суспензія дуже густа, то її розводять водою (розведення враховують під час перерахунку). Піпеткою з широким кінчиком швидко наносять по краплі суспензії клітин на кожну сітку лічильної камери Фукса–Розенталя, закривають її склом і притирають його до бічних граней сіток до появи кілець Ньютона. Підраховують клітини у чотирьох великих квадратах, розташованих по діагоналях сітки лічильної камери. Далі камеру знову заповнюють суспензією клітин і проводять повторний підрахунок. Операцію повторюють тричі для кожної пробірки. Кількість клітин у 1 г калюсної тканини обчислюють за формулою:

$$N = \frac{n \times 1000 \times V}{0,2 \times d},$$

де:  $N$  – кількість клітин у 1 г калюсної тканини;

$n$  – кількість клітин у одному великому квадраті;

$0,2$  – глибина камери Фукса–Розенталя;

$d$  – наважка калюсної тканини, яку використали для підрахунку клітин, г;

$V$  – кінцевий об'єм суспензії клітин, мл.

За результатами підрахунків будують графік залежності кількості клітин у 1 г калюсної тканини від співвідношення 2,4-Д–кінетик. Роблять висновок про оптимальне співвідношення ауксин–цитокінін у середовищі для калюсу.

### **Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Назвіть типи калюсної тканини.
2. Які складники живильного середовища впливають на щільність калюсної тканини?
3. Як впливає співвідношення ауксин–цитокінін на процеси органогенезу?
4. Для чого використовують пухкі калюси?
5. Який тип калюсної тканини використовують для отримання рослин-регенерантів?
6. Які показники визначають для характеристики росту калюсної тканини?

## Лабораторна робота 17. Отримання клітинної суспензії

**Основні відомості.** Клітинна суспензія – це окремі клітини або клітинні агрегати, які вирощують у рідкому живильному середовищі в умовах постійної аерації. Вирощування суспензійних культур у рідкому середовищі має низку переваг перед вирощуванням калюсних тканин поверхневим методом. У цих культурах легше впливати на метаболізм і ріст клітинних популяцій екзогенними факторами; вони зручніші для біохімічних і молекулярно-біологічних експериментів.

Основним способом отримання суспензійних культур є занурення шматочка калюсу в рідке середовище, яке перемішується. Для ініціації суспензійної культури потрібно 2–3 г калюсної тканини на 60–100 мл рідкого живильного середовища. Первинну суспензію отримують на шейкері, швидкість обертання якого 100–120 об/хв.

Суспензійну культуру можна отримати із фрагмента органу, однак це потребує більше часу: клітини експлантата мають утворити первинний калюс, який розпадається на окремі клітини.

Оптимальною для отримання високодиспергованої суспензійної культури є пухка, обводнена калюсна тканина, вирощена на середовищі з 2,4-Д, без іонів  $\text{Ca}^{2+}$ .

Для вирощування клітинних суспензій використовують в основному ті самі живильні середовища, що і для калюсних культур. Але є низка середовищ, призначених безпосередньо для вирощування суспензійних культур.

Щоб позбутися крупних, щільних грудок калюсної тканини, залишків експлантата або дуже крупних агрегатів, первинну суспензію перед субкультивуванням фільтрують крізь 1–2 шари марлі, нейлонові або металеві ситечка. До набуття клітинною суспензією бажаних ознак її необхідно фільтрувати під час субкультивування. Тривалість пасажу під час культивування клітинних суспензій становить 14–18 діб. Густина популяції за цю тривалість інкубації досягає  $10^6$ – $5 \cdot 10^6$  клітин/мл.

Ріст суспензійних культур можна оцінити за такими параметрами:

- *об'єм осаджених клітин (ООК);*
- *кількість клітин;*
- *сира і суха маса;*
- *вміст білка і ДНК;*
- *життєздатність клітин.*

Суспензійні культури рослинних тканин часто використовують для отримання традиційних для рослин сполук вторинного синтезу: алкалоїдів, терпеноїдів, глікозидів, полісахаридів, ефірних олій, антиканцерогенів тощо.

**Мета роботи:** отримати суспензійну культуру картоплі або тютюну, топінамбура і моркви.

**Матеріали, реактиви, обладнання:** калюсна культура картоплі, вирощена на середовищі № 1 для калюсу; колби Ерленмеєра місткістю 250 мл з рідким (без агару) середовищем № 1 для калюсу (100 мл середовища на колбу), стерильні

чашки Петрі, фольга, пінцети, скальпелі, спирт, спиртівка, ламінар-бокс, шейкер, стерильні лійки з нейлоновими фільтрами.

**Перебіг роботи.** Шматочки калюсної тканини переносять у стерильну чашку Петрі. Стерильним пінцетом подрібнюють калюс на фрагменти та приміщують їх у колби Ерленмеєра з рідким живильним середовищем (2–3 г/100 мл). Колби з рослинним матеріалом культивують у темряві на шейкері за 120 об/хв. За 10–14 діб середовище з клітинною суспензією фільтрують крізь нейлон. Фільтрат поділяють на три порції, які розливають у стерильні колби Ерленмеєра. До клітинної суспензії додають свіже середовище, доводять об'єм до 100 мл. Колби з суспензійною культурою знову помістити на шейкер та субкультивують клітинну суспензію кожні 14–18 діб. Для цього у ламінар-боксі з колби з клітинною суспензією відбирають 50–60 мл (приблизно 2/3 об'єму) середовища з клітинами та замінюють на свіже середовище того самого складу. Відібране середовище переносять у стерильну колбу Ерленмеєра і додають свіже середовище, щоб загальний об'єм становив 100 мл.

### Питання для контролю знань та самопідготовки

1. Що таке клітинна суспензія та для чого її використовують?
2. Які експлантати використовують для отримання суспензійної культури?
3. Калюсній тканині якого типу надається перевага для отримання клітинної суспензії?
4. Як довго триває пасаж під час культивування клітинних суспензій?
5. Назвіть показники, за якими оцінюють ріст суспензійної культури.
6. Назвіть переваги отримання вторинних метаболітів *in vitro*.
7. Які типи культур *in vitro* використовують для отримання речовин вторинного синтезу?

## Лабораторна робота 18.

### Ознайомлення з промисловими біотехнологічними виробництвами

**Основні відомості.** Промислова біотехнологія – це одержання різних цільових продуктів на основі життєдіяльності мікроорганізмів. Її основою є робота з мікробними організмами.

**Об'єкти біотехнологічного процесу та вимоги до продуцентів.** Біологічні об'єкти, які застосовують у галузі біотехнології, характеризуються рівнем структурної організації, здатністю до розмноження, наявністю або відсутністю власного метаболізму під час культивування за належних умов. Більшість об'єктів біотехнології – це бактерії, актиноміцети, рикетсії, синьо-зелені водорості, дріжджі, нитчасті гриби, мікроскопічні найпростіші та водорості. До них як до організмів, що використовуються у біотехнології, висувуються такі вимоги:

- *легкий та високий стабільний вихід цільового продукту;*
- *невисока ціна середовищ;*
- *простота культивування;*
- *висока швидкість росту і вихід продукту за коротких час;*
- *зберігання характеристик під час тривалого культивування;*
- *стійкість до можливих інших мікроорганізмів;*
- *безпечність для оточуючого середовища.*

Біотехнологічні об'єкти застосовують для отримання трьох основних груп біотехнологічної продукції:

• *медична – антибіотики, гормони, вітаміни, лізоцим, інтерферон, інсулін, інтерлейкіни, моноклональні тіла, напівсинтетичні вакцини, живі вакцини;*

• *промислова – розчинники, бактеріальні добрива, пестициди, рідке та газоподібне паливо, речовини для біоконверсії рослинної та тваринної сировини, очищення стічних вод;*

• *продовольча – мікробний білок, незамінні амінокислоти, пептиди, цукрозамінники, нуклеотиди, нуклеозиди, ферменти, органічні кислоти, спирти, полісахариди, харчові продукти.*

**Мета роботи:** ознайомити здобувачів вищої освіти з процесами та методами біотехнологічного виробництва.

**Перебіг роботи.** Виробничий етап біотехнологічного процесу – це сукупність послідовних операцій від початку функціонування об'єкта до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації, які можуть бути обумовлені вичерпанням компонентів живильного середовища, старінням культури, зміненням характеристики об'єкта. Усі необхідні параметри контролюються автоматично і в динаміці. За необхідності, у разі відхилення від заданих характеристик проводиться їх корекція: внесення необхідних компонентів, або їх видалення. Схема біотехнологічного виробництва включає в себе такі стадії:

1. *Стадія підготовки.*
2. *Біотехнологічна стадія.*
3. *Розділення рідини та біомаси.*
4. *Виділення позаклітинних або внутрішньоклітинних продуктів.*
5. *Очищення продукту.*

6. Концентрування продукту.

7. Виготовлення готової форми продукту.

**Стадія підготовки** включає такі процеси:

- виготовлення середовища – у більшості рідкого, яке вміщує необхідні компоненти для живлення біотехнологічних об'єктів;
- стерилізація середовища – для асептичних біотехнологічних процесів, де попадання сторонньої мікрофлори не бажане.

Підготовка до стерилізації газів (зокрема повітря) є необхідною для протікання біотехнологічного процесу. Найчастіше підготовка повітря містить очищення його від пилу, вологи, мікроорганізмів та їх спор, надання необхідної температури. Підготовка посівного матеріалу для проведення мікробіологічного процесу, процесу культивування відокремлених клітин рослин або тварин полягає у вирощуванні малої кількості матеріалу, порівняно з кількістю біологічного агента цільової стадії.

**Біотехнологічна стадія** – перетворення субстрату за участю біологічних об'єктів (мікроорганізмів, ізолюваних клітин, ферментів або клітинної органели) у необхідний продукт. Ця стадія містить низку різних біотехнологічних процесів: ферментація, біотрансформація, біоокислення, метанове бродіння, біокомпостування, біосорбція, біодеградація, бактеріальне вилуджування.

**Стадія розділення рідини й біомаси** включає такі процеси:

- відстоювання – розділення під дією гравітаційних сил (під час очищення стічних вод);
- фільтрація – пропускання суспензії крізь фільтруючий матеріал, на якому затримуються частки твердої фази – біомаса (виробництво антибіотиків);
- сепарація, центрифугування – розподіл під дією центробіжних сил (виробництво кормової біомаси – дріжджів, бактерій).
- мікрофільтрація, ультрафільтрація – пропускання суспензії крізь мембрани з малим діаметром пор, котрі забезпечують утримання клітин мікроорганізмів; ультрафільтрація забезпечує затримання крупних молекул розчинних речовин;
- коагуляція – додавання до суспензії реагентів, які допомагають осадженню більш крупних клітинних агрегатів і відділенню їх із рідини шляхом відстоювання;
- флотація – захоплення біомаси мікроорганізмів кульками піни і виділення їх із пінної фракції.

**Стадія виділення продуктів біосинтезу** залежить від місця локалізації продукту – внутрішньоклітинного або позаклітинного. Для внутрішньоклітинних продуктів спочатку здійснюють руйнування клітинної оболонки одним із таких методів:

- дезінтеграція клітин – руйнування клітинної оболонки фізичними методами – роздавлюванням;
- дією ультразвуку методом різкого зниження тиску (декомпресією) або хімічними й біотехнічними методами.

Найбільш часто використовують:

- ферментоліз – руйнування клітинних оболонок під дією ферментів за підвищеної температури;

- *гідроліз* – руйнування клітинних оболонок під дією хімічних реагентів та температур;

- *автоліз* – різновидність ферментолізу, коли використовують ферменти цієї ж клітини.

Після проведення попередньої операції руйнування клітин виділення цільового продукту здійснюється із розчину методами, які є загальними для позаклітинних і внутрішньоклітинних продуктів:

- *екстракція* – *перехід цільового продукту з водної фази в незмішану з водою органічну рідину (екстрагент – бензин, хлороформ, ефір, бутилацетат). Екстракція прямо із твердої фази (зокрема їх біомаси мікроорганізмів) має назву екстрагування;*

- *осадження* – *виділення цільового продукту шляхом додавання до рідини реагенту, який взаємодіє з розчиненим продуктом, переводячи його у тверду фазу;*

- *адсорбція* – *переведення розчиненого в рідині продукту у тверду фазу шляхом його сорбції на спеціальних твердих носіях (сорбентах);*

- *іонний обмін* – *такий самий, як і адсорбція, але в цьому випадку у тверду фазу переходять іони (катіон та аніон), а ціла молекула цільового продукту або домішок;*

- *відгін, ректифікація* – *ці методи використовують для виділення розчинених у культуральній рідині легко киплячих продуктів (етиловий спирт);*

- *ультрафільтрація, нанофільтрація і зворотний осмос* – *використовують для виділення високомолекулярних з'єднань (білків, поліпептидів, полінуклітидів). Нанофільтрація і зворотний осмос дають змогу відокремити також невеликі за розміром молекули;*

- *центрифугування, ультрацентрифугування* – *використовують для виділення вірусів, клітинних органел, високомолекулярних сполук.*

**Стадія очищення продукту** – видалення домішок та одержання максимально чистого продукту. Для цього використовують екстракцію, екстрагування, адсорбцію, іонний обмін, ультрафільтрацію, поверхневий осмос, ректифікацію і ферментоліз, хроматографію, діаліз, кристалізацію.

**Концентрування продукту.** Після очищення продукту він часто перебуває у розчині в невеликій концентрації. На різних біотехнологічних стадіях концентрація цільового продукту змінюється так: на біотехнологічній стадії суспензія має приблизно 0,1–1 % цільового продукту, після стадії відокремлення біомаси – 0,1–2 %, після стадії виділення – 1–10 %, після очищення 50–80 %, після концентрування – 90–100 %. На стадії концентрування використовують випарювання, сушіння, осадження, кристалізацію з фільтрацією добутих кристалів, ультрафільтрацію, нанофільтрацію, «віджимання» розчинника з розчину.

**Стадія отримання готової форми продукту** – кінцева стадія, на якій продукт набуває товарної форми завдяки процесам гранулювання (формування прямо з розчину), таблетування, розливу або фасування, ампулювання.

### **Питання для контролю знань та самопідготовки**

1. Охарактеризуйте біотехнологічний процес та біотехнологічне виробництво.
2. Наведіть характеристику об'єктів біотехнологічного виробництва.
3. На які стадії поділяється біотехнологічний процес?
4. Що відбувається на біотехнологічній стадії?
5. Які процеси включає стадія розділення рідини й біомаси?
6. Як відбувається виділення продуктів біосинтезу, від чого залежить його проведення?
7. Охарактеризуйте стадії очищення продукту, концентрування продукту та отримання готової форми продукту.

## Лабораторна робота 19. Технологія виробництва біогазу

**Основні відомості.** Біогаз – це горючий газ, який складається з метану ( $\text{CH}_4$  – 50–75 %), вуглекислого газу ( $\text{CO}_2$  – 25–50 %), водяної пари ( $\text{H}_2\text{O}$  – 0–10 %), азоту (0,01–5 %), кисню (0,01–2 %), водню ( $\text{H}_2$  – 0–1 %), аміаку (0,01–2,5 мг/м<sup>3</sup>) та сірководню ( $\text{H}_2\text{S}$  – 10–30 мг/м<sup>3</sup>). Основним компонентом біогазу є горючий газ метан, під час згоряння якого вивільняється енергія. Вміст метану в біогазі багато в чому залежить від використовуваних матеріалів і процесу бродіння. Біометаногенез – складний мікробіологічний процес, у якому органічна речовина розкладається до діоксиду вуглецю і метану в аеробних умовах.

**Мета роботи:** оволодіти основними відомостями про роль біотехнології у охороні довкілля; опанувати знання про біодеструкцію відходів агропромислового комплексу та отримання біогазу.

### Перебіг роботи

**Продукти біогазової установки.** Для отримання біогазу використовують відходи сільського господарства, зіпсовані продукти, стоки крохмалопереробних



Рис. 34 – Біогаз та його використання

- Біогаз  $\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O}$ ;
- Біометан – аналог природного газу (90–98 % метану).
- підприємств, рідкі відходи цукрових буряків, побутові відходи, стічні
- Паливо для транспортних засобів;
- Постачання біометану в газотранспортну мережу;

води міст і спиртних заводів. Процес відбувається за температури 30–60 °С, рН 6–8.

У наш час для виробництва біогазу частіше використовують вторинні відходи (відходи тваринництва, стічні води міст). Подача відходів і відбір відпрацьованого стоку здійснюється в нижній частині реактора. Біогазові установки можуть працювати:

- *завдяки використанню відходів сільськогосподарського виробництва в біогазовій установці (одночасно можна вирішити проблеми навколишнього середовища);*
- *завдяки відходам (залишки бродіння), що залишаються від виробництва біогазу в біогазових установках, є високоякісним добривом. Їх можна продавати або використовувати замість дорогого штучного добрива;*

- біогазові установки можна реалізовувати в межах Проєктів спільного впровадження (відповідно до Кіотського протоколу) і завдяки продажу квот на викиди CO<sub>2</sub> отримувати додаткові доходи.

**Процес утворення біогазу.** Біогаз утворюється внаслідок природного процесу мікробного розкладання органічної маси у вологому середовищі в анаеробних умовах (за відсутності кисню). У ферментері (біореакторі) бактерії, що зустрічаються в природі, викликають бродіння органічних речовин, подібне до того, яке відбувається в рубцях (шлунках) жуйних тварин. У біогазових установках знаходять застосування насамперед сільськогосподарські субстрати (гнійна рідина, стійловий гній або енергетичні культури (кукурудза, жито, цукровий буряк тощо). Інші субстрати є побічними продуктами переробної сільськогосподарської промисловості. До них належать, наприклад, відходи від виробництва пива (дробина), спирту (барда), біодизелю (ріпакова макуха, сирий гліцерин), переробки картоплі (жом), виробництва цукру (бурякова січка, меляса) та побічні продукти переробки фруктів (вичавки).

У виробництві біогазу використовуються органічні відходи комунального господарства (осад стічних вод, побутові відходи, органічні відходи, скошена трава, ландшафтний матеріал та ін.). Усі ці субстрати розкладаються за однаковим принципом у чотири етапи у ферментерах під впливом мікроорганізмів до біогазу. Вироблений біогаз збирається за допомогою відповідного технічного обладнання і спалюється безпосередньо на блочній ТЕЦ або збагачується до біометану (очищеного біогазу).

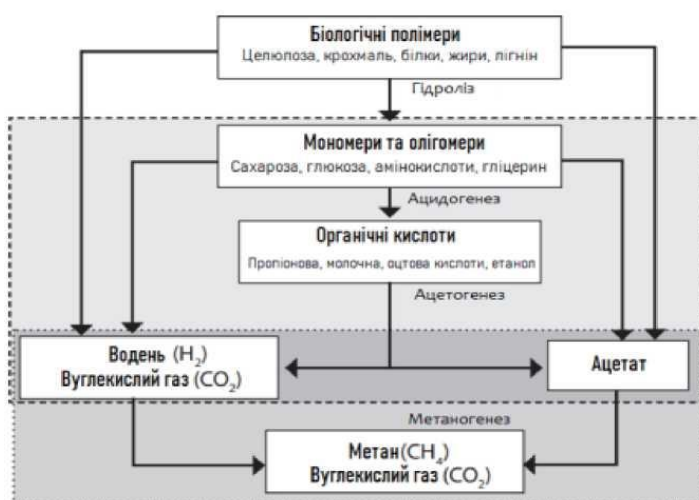


Рис. 35 – Утворення біогазу

Процес анаеробного бродіння у промисловості є процесом розкладання складних органічних речовин складним угрупованням мікроорганізмів з виділенням біогазу, що містить 50–70 % метану, 30–40 % вуглекислого газу та інші складники, як-от сірководень, водень та азот.

Анаеробне зброджування – це мікробіологічний процес, під час якого органічна речовина розкладається до суміші газів за відсутності кисню. Цей процес є поширеним у багатьох природних середовищах, як-от болота або шлунки жуйних тварин, і знайшов масштабне застосування у промисловості. Процес утворення біогазу є результатом взаємопов’язаних етапів процесу, в якому початковий матеріал постійно розкладається на більш прості молекули.

У кожному окремому етапі бере участь своя група мікроорганізмів. Вони послідовно розкладають продукти з попередніх етапів. Отримання біогазу з складних органічних речовин проходить в чотири стадії: гідроліз, ацидогенез, ацетогенез та власне метаногенез. Швидкість процесу повного розкладання визначається найповільнішою реакцією.

Ось спрощена схема перетворень, що відбуваються у процесі метаногенезу:

**Фаза гідролізу.** Анаеробні бактерії під дією ензимів (амілаз, протеаз, ліпаз) розщеплюють високомолекулярні сполуки (білок, вуглеводи, ліпіди, целюлозу) органічних субстратів на низькомолекулярні сполуки – метаболіти (цукор, амінокислоти, жирні кислоти, глюкозу й воду).

**Фаза окислення або ацидогенезу.** Період формування необхідних умов активації метанових бактерій завдяки залученню до процесу ферментації молекул кислот, утворених бактеріями. В анаеробних умовах утворюються нестійкі органічні кислоти – оцтова, мурашина, молочна, пропіонова, масляна, низькомолекулярні спирти та гази – діоксид вуглецю, водень, сірководень та аміак.

**Фаза зброджування або ацетилогенезу.** З органічних кислот здійснюється утворення оксикислот, зокрема й пірвіноградної кислоти. Фаза ацетилогенезу – для отримання вихідних продуктів створення метану, що дає енергетичне проміжне з'єднання ацетил-КоА, двоокису вуглецю і водень.

**Фаза метаногенезу.** Відновлення ацетил-КоА і  $\text{CO}_2$  з утворенням  $\text{CH}_4$ , двоокису вуглецю і води як продуктів життєдіяльності метанових бактерій.

Енергетичний потенціал біогазу та біометану складається з різноманітних потенціалів:

- *потенціал площ для вирощування енергетичних культур;*
- *потенціали обробної промисловості (органічні відходи);*
- *потенціал використання відходів комунального господарства;*
- *підвищення ефективності у вирощуванні енергетичних культур на гектар площі;*
- *різноманітні потенціали можливостей використання біогазу, наприклад, чисте виробництво електроенергії, виробництво електроенергії і тепла (ТЕЦ) або використання в якості пального для транспорту.*

До того ж вирішальну роль у розвитку біоенергетики і ефективному використанні наявних потенціалів відіграють політичні і правові рамкові умови, а також наявна інфраструктура.

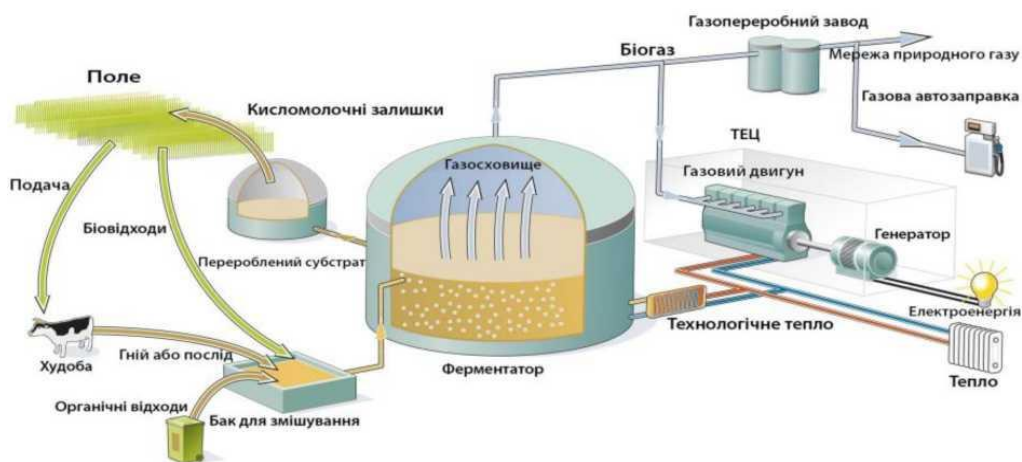


Рис. 36 – Біогазова станція

**Матеріально-технічне забезпечення.** Безперервна експлуатація біогазової установки передбачає безперервну подачу до неї субстрату. Через це труднощі виникають у оператора установки в основному на підготовчому етапі. Зокрема, у разі використання відновлюваної сировини необхідні ретельне планування і підготовка циклу постачання біомаси, який складається зі збирання, транспортування і зберігання біомаси з метою забезпечення безперебійної експлуатації установки.



Рис. 37 – Схематичне зображення сільськогосподарської біогазової станції

### Можливості використання біогазу:

- 1) біогаз може застосовуватися на місці його виробництва у якості палива;
- 2) з біогазу можна виробляти енергію;
- 3) можна використовувати відхідне тепло, яке утворюється під час виробництва енергії;
- 4) біогаз, доведений до якості природного газу (біометану), може подаватися в загальну газорозподільну мережу, яка є відмінним шляхом транспортування біогазу до споживачів та енергонакопичувачів.

### Питання для контролю знань та самопідготовки

1. Які можливості використання біогазу?
2. Опишіть процес утворення біогазу.
3. Продукти біогазової установки.

## Лабораторна робота 20.

### Меристемна культура декоративних рослин у середовищі МС

**Основні відомості.** Декоративні рослини (тройнда, гербера та ін.), що розмножуються вегетативно, є господарями низки бактерій, вірусів і багатьох інших патогенів. З бактеріальними та грибовими захворюваннями можна боротися за допомогою використання хімікатів або поліпшення агротехніки. Однак за допомогою цих методів не можна контролювати вірусні захворювання.

Звільнення рослин від зараження вірусами стало досить легким з появою методики культивування меристем. Методика заснована на тому, що концентрація вірусних частинок набагато менша в зонах інтенсивного зростання пагонів і кінчиків коренів, ніж в інших частинах рослини. Рослини, отримані з меристем (0,3–0,5 мм завдовжки) на живильному середовищі зазвичай вільні від вірусів. Для зменшення ймовірності зараження меристемних культур вірусами використовують додаткові заходи пригнічення збудників. Зокрема, термотерапію (35–40 °С) і хіміотерапію (98-Азагуанін, 5-фторурацил тощо) Відомо, що ці засоби пригнічують реплікацію багатьох вірусів. Тому хіміотерапія і термотерапія рослин до культури меристем або під час культивування сприяє усуненню низки вірусів, які є складними для усунення лише за допомогою меристемної культури. Тому меристемна культура стала важливим засобом для звільнення цілої низки декоративних (тройнда, гвоздика, жоржини) та сортів сільськогосподарських рослин (банан, цукрова тростина та картопля) від вірусних інфекцій і підвищення їх декоративності та продуктивності.

**Мета роботи:** оволодіти методами отримання меристемних культур декоративних рослин, вільних від вірусного зараження.

**Матеріали, реактиви, обладнання:** культуральна пляшка, що містить мости фільтрувального паперу та базове рідке середовище МС, доповнене 2 мг/л БАТ, 0,1 мг/л ГА 3–2 мг/л ІВА та 20 г/л сахарози; скляні чашки Петрі, що містять фільтрувальний папір; конічна колба, що містить стерильну дистильовану воду; пінцети; флакон, що містить 10 мл 0,8 % агарового базового МС середовища, доповненого 2 мг/л кальцію пантотенату; 0,1 мг/л ГА 3, 0,01 мг/л НАА і 30 г/л сахарози; 25 % розчин гіпохлориту натрію; 4 % хлорид ртуті; 95 % та 70 % етанолу, Tween 20; Laboline; штатив з пробірками; термостат 37 °С; скальпель; ламінар-бокс; пальник.

**Перебіг роботи.** Для отримання безвірусного рослинного матеріалу використовують виокремлені кінчики меристеми з верхівкової бруньки пагону материнських рослин, вирощуваних протягом 5 тижнів за 37 °С. Робота включає декілька етапів: індукцію пагонів, інкубацію пагонів, розмноження та перенесення у ґрунтову культуру.

**Індукція пагонів.** З рослин, що ростуть у горщиках, вирізають верхівкові частини пагонів довжиною 10 мм, видаляють розкрите листя з верхівкових кінчиків і промивають їх під струменем водопровідної води. Переносять частини пагонів у чашки Петрі, які містять фільтрувальний папір, і скальпелем вилучають верхівки пагонів. Видаляють рудиментарні листки за допомогою стерильного скальпеля і голки. Від верхівки пагону відрізають кінчик меристеми (безпосередньо зону ділення) завдовжки 0,3–1 мм. Відрізаний кінчик меристеми переносять у простерилізовану

над полум'ям пальника культуральну пробірку на місток фільтрувального паперу за допомогою наконечника скальпеля. Горловину пробірки обпалюють та закривають її пробкою.

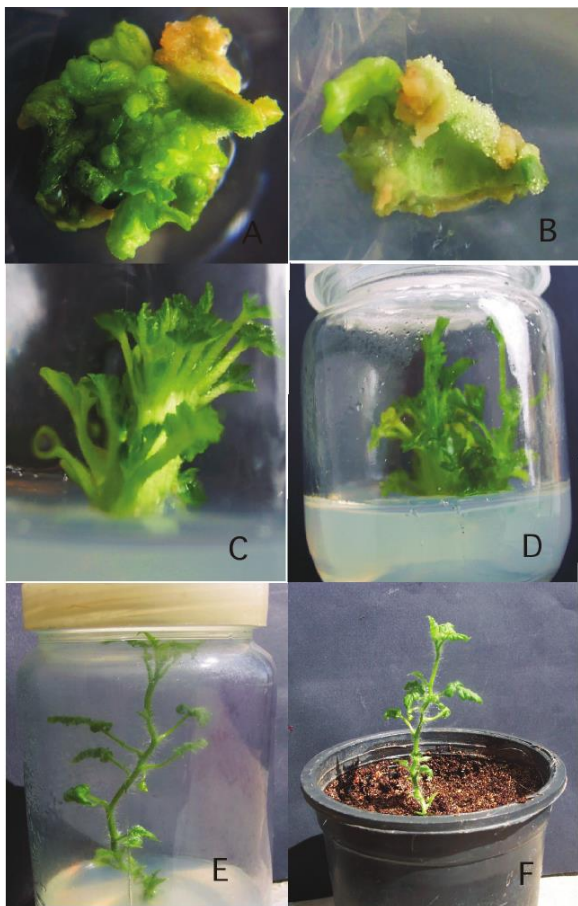


Рис. 38 – Основні етапи отримання меристемної культури

ревіряються на віруси методом ІФА. Отримані в такий спосіб безвірусні рослини додатково розмножуються або для збереження *in vitro*, або для швидкого виробництва посадкового матеріалу.

**Перенесення у ґрунтову культуру.** Для отримання посадкового матеріалу рослини з живильного середовища переносяться у ґрунт. Зазвичай на початковому етапі такі рослини деякий час культивуються у лабораторних умовах, а в подальшому вони пересаджуються у виробничі умови залежно від завдань (відкритий або закритий ґрунт).

### Питання для контролю знань та самопідготовки

1. Дайте визначення понять «мікроклональне розмноження», «*in vitro*», «*in vivo*».
2. На чому ґрунтується метод термотерапії та хемотерапії?
3. Метод культури апікальних меристем.
4. Назвіть способи одержання безвірусних рослин.
5. Назвіть етапи мікроклонального розмноження та які переваги воно має.
6. На які етапи поділяється процес отримання безвірусних рослин? Наведіть коротку характеристику кожного етапу.

**Інкубація культури.** Пробірку з внесеними частинами пагонів приміщують для вирощування на стелаж за температури 25 °С та забезпечують освітлення з 16-годинним фотоперіодом (використовується одна люмінесцентна трубка потужність 20 Вт, розташована на відстані 300 мм від об'єкта). Вирощування проводять протягом 5–6 тижнів. За цей час розвивається щільне скупчення пагонів. Приблизно через два тижні подальшого росту ці пагони січуть та інокулюють ними агарове середовище у свіжих культуральних пробірках за асептичних умов. Ці пробірки з перенесеними в них рослинами інкубують за температури 25 °С фотоперіодом 12–16 год. Через 3–4 дні починає розвиватися корінь і протягом 20 днів він досягає довжини 60–90 мм. Також розвиваються довгі пагони. Це засвідчує те, що рослин готові до розмноження.

**Розмноження.** У культурі *in vitro* розмножуються рослини, отримані з апікальних меристем за допомогою вузлового розділення. Отримані *in vitro* рослини пере-

## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Авксентьева О. О., Шулік В. В. Біотехнологія вищих рослин: культура *in vitro*: навч.-метод. посібник. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2017. 92 с.
2. Ващенко О. В. Методичні вказівки до лабораторних робіт з технічної мікробіології для студентів напрямку підготовки 6091501 «Харчові технології та інженерія». Харків: НТУ «ХП», 2008. 72 с.
3. Герасименко В. Г. Біотехнологія: підручник. Київ: Фірма «ІНККОС», 2006. 647 с.
4. Задерей Н. С. Біотехнологія рослин: навч.-метод. посіб. Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2015. 84 с.
5. Калетнік Г. М. Доцільність виробництва біогазу в Україні. URL: [http://www.rusnauka.com/34\\_NIEK\\_2010/Economics/75102.doc.htm](http://www.rusnauka.com/34_NIEK_2010/Economics/75102.doc.htm)
6. Лобова О. В., Пилипчук О. О. Основи біотехнології рослин: методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів з напряму підготовки 6.051401 «Екобіотехнологія». Київ: НУБІП, 2014. 17 с.
7. Манушкіна Т. М. Біотехнологія в рослинництві: курс лекцій. Миколаїв: МНАУ, 2014. 51 с.
8. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин: підручник. Київ: Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.
9. Митропольська Н. Ю., Бухало А. С. Колекція культур вищих базидіальних грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного АН України. *Український ботанічний журнал*. 1994. № 51(1). С. 125–130.
10. Мусієнко М. М. Біотехнологія рослин: навч. посіб. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. 114 с.
11. Основи біотехнології рослин. Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» напряму 6.051401 – «Біотехнологія». Миколаїв 2017. 48 с.
12. Паршикова Т. В., Войцехівська О. В., Капустин А. В., Косик О. І., Мусієнко М. М., Ольхович О. П., Панюта О. О., Славни П. С. Фізіологія рослин: практикум. Луцьк: Терен, 2010. 420 с.
13. Патрева Л. С., Люта І. М. Управління якістю та безпечністю біотехнологічної продукції: методичні рекомендації для виконання лабораторно-практичної та самостійної роботи здобувачами вищої освіти СВО «Магістр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навчання. Миколаїв, 2020. 69 с.
14. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: підручник. Київ: НУХТ, 2010. 623 с.
15. Продукування біогазу та органічних добрив в агровиробництві. *Альтернативні джерела енергії*: підручник / В. П. Чучуй, С. М. Уминський, С. В. Інютін. Одеса: ТЕС. 2015. 234 с. URL: [http://pidruchniki.com/73010/ekologiya/produktuvannya\\_biogazu\\_organichnih\\_dobriv\\_virobnitstvi](http://pidruchniki.com/73010/ekologiya/produktuvannya_biogazu_organichnih_dobriv_virobnitstvi)
16. Рейнхард Ш. Виробництво і використання біогазу в Україні / Рада з питань біогазу з.т. / Biogasrat e.V. травень, 2012. 40 с.
17. Рудишин С. Д. Основи біотехнології рослин. Вінниця, 1998. 272 с.
18. Рябовол Л. О., Рябовол Я. С. Мікроклональне розмноження рослинного матеріалу: методичні вказівки для лабораторних занять студентів з дисципліни

«Основи біотехнології в рослинництві» зі спеціальностей 201 «Агрономія», 202 «Захист і карантин рослин», 203 «Садівництво та виноградарство» вищих аграрних закладів освіти III–IV рівнів акредитації. Умань: УНУС, 2019. 16 с.

19. Юлевич О. І. Біотехнологія: курс лекцій. Миколаїв: МДАУ, 2007. 156 с.

20. Anjana R. Joy P. P. Plant Biotechnology Laboratory Manual. Kerala agricultural university pineapple research station, 2014. 67 p.

21. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies; Proposed Rule Docket No. FDA-2010-N-0548 Preliminary Regulatory Impact Analysis Initial Regulatory Flexibility Analysis Unfunded Mandates Reform Act Analysis Economics Staff Office of Planning Office of Policy and Planning Office of the Commissioner. August 2016.

22. Graham P. B. Good Manufacturing Practices for Pharmaceuticals. Seventh Edition. 2019 by Taylor & Francis Group, LLC. 3876 p.

23. Kapiel T. Ye. Cell and tissue culture BT 202. Laboratory manual. Faculty of Biotechnology October University for Modern Sciences and Arts (MSA), 2022. 35 p.

24. OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997) Environment Directorate. 41 p.

25. Samal K. Ch., Rout G. R. Practical Manual on Plant Tissue Culture and its certification. 2nd Edition. Orissa University of Agriculture and Technology, Bhubaneswar, Odisha, 2018. 126 p.

26. Лабораторна робота № 1. Організація і техніка культивування клітин та тканин рослин в умовах *in vitro*. URL: <https://www.slideshare.net/ssuserbdf641/1-34293390>



