

**Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича**

Л.М. Чебан

**Загальна біотехнологія:
Навчально-методичний посібник
Модуль 1**

**Чернівці
Чернівецький національний університет
2017**

УДК 60(072)
ББК 35.67я73
Ч – 34

Друкується за ухвалою редакційно-видавничої ради
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича

Чебан Л.М. Загальна біотехнологія: навчально-методичний посібник. Модуль 1. – Чернівці: Чернівецький нац.ун-т, 2017. – 116 с.

Навчально-методичний посібник розроблений згідно з програмою нормативного курсу „Загальна біотехнологія”. Видання дозволяє полегшити засвоєння студентами теоретичних і практичних питань з курсу «Загальна біотехнологія».

Для студентів вищих навчальних закладів спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія.

ЧНУ, 2017

ЗМІСТ

Зміст	3
Словник основних термінів з курсу «Загальна біотехнологія»	5
Розділ 1. Лабораторний практикум	12
Тема 1. Біотехнологічна лабораторія: структура, обладнання, умови роботи	12
Лабораторна робота № 1. Приготування стерильного посуду та розхідних матеріалів для культивування біологічних агентів	17
Тема 2. Методи культивування аеробних та анаеробних мікроорганізмів.	19
Лабораторна робота № 2. Культивування аеробних мікроорганізмів	25
Лабораторна робота № 3. Способи культивування анаеробних мікроорганізмів	27
Тема 3. Отримання чистих культур мікроорганізмів – як основний етап створення штамів продуцентів	29
Лабораторна робота № 4. Отримання окремих колоній мікроорганізмів методом серійних розведень	33
Лабораторна робота № 5. Отримання окремих колоній мікроорганізмів методом виснажу вального штриха	36
Тема. 4. Визначення параметрів культивування біологічних агентів	39
Лабораторна робота № 6. Визначення біомаси зважуванням	40
Лабораторна робота №7. Встановлення характеру росту досліджуваних культур	42
Лабораторна робота №8. Вивчення можливості утворення цільового продукту: вироблення електричного струму мікроорганізмами	44
Тема 5. Вивчення біологічної активності біотехнологічних препаратів	46
Лабораторна робота № 9. Дослідження біологічної активності деяких антибіотиків методом дифузії	48

Лабораторна робота № 10. Скринінгове дослідження антимікробної активності рослинних екстрактів	51
Тема. 6. Знешкодження відходів біотехнологічних виробництв	53
Лабораторна робота №11. Біотехнологічна очистка стічних вод	55
Тема. 7. Санітарно-гігієнічний контроль на біотехнологічних підприємствах	57
Лабораторна робота № 12. Аналіз санітарного стану устаткування біотехнологічних виробництв	60
Розділ II. Тестові завдання з курсу «Загальна біотехнологія»	62
Становлення та розвиток біотехнології	62
Основні складові біотехнологічного процесу	64
Методи біотехнології. Культивування клітин.	70
Біореактори	
Етапи біотехнологічного процесу.	75
Передферментаційний процес	
Ферментаційний процес. Виробничий біосинтез	82
Постферментативний процес.	88
Знешкодження відходів біотехнологічних виробництв	
Біотехнологія отримання продуктів мікробіологічного синтезу	91
Біотехнологія отримання органічних кислот	95
Біотехнологія вітамінних препаратів	97
Біотехнологія ферментних препаратів	101
Біотехнологія гормонів	105
Культура тваринних тканин і клітин	108
Розділ III. Приклади розв'язування типових задач	111

СЛОВНИК ОСНОВНИХ ТЕРМІНІВ З КУРСУ «ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

In vitro – вирощування об'єктів «за склом» у культуральному посуді (пробірки, колби, біореактори) на штучних поживних середовищах, в асептичних умовах.

In vivo – проходження всіх процесів росту і розвитку клітин, тканин і органів рослин без вилучення їх з материнського організму за умов збереження всіх внутрішньоорганізменних корелятивних зв'язків.

Автоклав – герметично закритий апарат для стерилізації водяною парою при підвищеному тиску і температурі вище точки кипіння; вживається для стерилізації хімічного посуду, розчинів, середовищ, для різних технічних цілей.

Автоліз – лізис клітин мікроорганізмів під дією власних ферментів.

Автотрофія – живлення організмів (автотрофів) неорганічними речовинами, що здійснюється через фотосинтез, або хемосинтез.

Агар – суміш полісахаридів, екстрагованих з червоних водоростей, які формують гель за температури нижче 40°C. Використовують для приготування живильних середовищ та інших прикладних цілей в біотехнологічних дослідженнях.

Агароза – безсульфатна фракція агару. Використовується як носій для проведення гель-електрофорезу.

Адсорбція - процес поглинання речовини поверхневим шаром твердого тіла або рідини (адсорбенту); застосовується для розділення або очищення речовин.

Алель – одна з двох (чи кількох) альтернативних структурних форм гена.

Анаеробний мікроорганізм – мікроорганізм, що росте за відсутності кисню.

Анаеростат - прилад для створення та стабільної підтримки анаеробних умов, використовуваний для культивування анаеробів.

Аеробний мікроорганізм – мікроорганізм, що росте тільки за присутності кисню.

Барда – відходи при виробництві етилового спирту (близько 13 л на кожен л спирту), що містить близько 6% сухої речовини.

Білки теплового шоку – білки, що синтезуються у відповідь на різке підвищення температури.

Біоаккумуляція – накопичення якої-небудь речовини в організмах одного харчового ланцюга.

Біодеградація (біологічний розпад, біорозкладання) — руйнування складних речовин, матеріалів, продуктів у результаті діяльності живих організмів; найчастіше мається на увазі дія мікроорганізмів, грибів, водоростей.

Біомаса – клітинна маса, що утворюється в процесі вирощування організмів.

Біотехнологія – будь-який вид технології, пов'язаний з використанням біологічних систем живих організмів або їх похідних з метою отримання цільового продукту.

Біотрансформація - серія хімічних перетворень речовин, які відбуваються в організмі під дією ферментів.

Біореактор, ферментер - апарат для культивування мікроорганізмів або еукаріотичних клітин, в якому протікають ферментативні біохімічні реакції за участю живих клітин або клітинних екстрактів.

Біоремедіація — комплекс методів очищення води, ґрунтів і атмосфери з використанням метаболічного потенціалу живих організмів (рослин, грибів, комах, бактерій та ін.) або їх ферментів.

Вектор – молекула ДНК (наприклад, бактеріальна плазміда), що здатна до самореплікації та використовується в генній інженерії для переносу генів від організму-донора до організму-реципієнта.

Вірулентність – характеристика патогенності мікроорганізмів.

Гамета – репродуктивна гаплоїдна клітина багатоклітинного організму.

Гаплоїдний – термін, що характеризує організм (клітину), який містить один набір хромосом.

Ген – ділянка хромосоми, що кодує функціональний білок або тРНК чи рРНК.

Геном – сукупність генів гаплоїдного набору хромосом

даного організму.

Гідрол – побічний продукт, що утворюється при отриманні глюкози з крохмалу, використовується як живильне середовище для культивування біологічних агентів.

Дедиференціація – перехід спеціалізованих клітин до проліферації та неорганізованого калюсного росту, що призводить до втрати клітинами спеціалізації.

Діазотроф – організм, що здатен фіксувати азот.

Діаліз – процес поділу молекул за розміром на основі їх різної здатності до дифузії через напівпроникну мембрану; використовується для очищення високомолекулярних речовин від низькомолекулярних домішок (напр., білків від солей).

Диференціація – комплекс фізіологічно-біохімічних процесів, що призводять до появи відмінностей між клітинами.

Експлант (експлантат) – фрагмент тканини чи органу, що використовується для введення в культуру *in vitro* для самостійного культивування або для отримання первинного калюса.

Еталонний тест-штам – чиста культура мікроорганізму окремого виду, яка має характерні фізіологічні, морфологічні та біохімічні властивості.

Живильне середовище – субстанція, яка використовується для лабораторного вирощування організмів.

Імобілізація – метод стабілізації недостатньо стійких речовин шляхом обмеження їх рухливості.

Ініціація – початок синтезу полімера.

Інокулюм – частина суспензійної культури, що використовується для перенесення на свіже живильне середовище.

Інсектицид – речовини чи живі організми, що згубно діють на комах.

Калюс – група дедиференційованих клітин, що виникають *in vivo* чи *in vitro* шляхом неорганізованої проліферації.

Калюсна культура – вирощування у стерильних, строго контрольованих умовах тканин, що виникли шляхом проліферації клітин ізольованих сегментів різних органів рослин.

Клітинна популяція – популяція будь-яких клітин, використовуваних у біотехнології (як прокариот, так і еукариот).

Клон – популяція клітин чи особин, що виникла нестатевим шляхом від одного спільного предка. Усі клітини клону містять однаковий генетичний матеріал і є копіями оригіналу.

Коферментація – одночасний ріст двох мікроорганізмів в одному біореакторі.

Крива росту – крива, що описує залежність логарифму кількості живих клітин від тривалості культивування.

Культивування мікроорганізмів – це процес вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах.

Культура *in vitro* – вирощування у спеціально підібраних штучно створених умовах мікроорганізмів, клітин, тканин і органів рослин і тварин.

Культура тривалого зберігання – культура еталонного тесту-штаму в умовах тривалого зберігання (ліофільновисушена культура, кріоконсервація; напіврідке середовище під стерильним мінеральним (вазелиновим) маслом, скошене агаризоване середовище).

Культура тимчасового зберігання – культура еталонного тесту-штаму в умовах тимчасового зберігання на відповідному середовищі.

Культура цільового використання – субкультура, що пройшла не більше 5 пасажів після висіву із культури тимчасового зберігання, призначена для використання в аналізі.

Культуральна рідина – складна колоїдна система, суміш живильного середовища, культури мікроорганізмів, продуктів життєдіяльності та відпрацьованих газів.

Лізис – руйнування клітинних стінок під впливом ферментів, що містяться в лізосомах.

Лінія – культура, що виникла зі штаму шляхом селекції чи клонування і володіє маркерними ознаками.

Меляса – побічний продукт цукрового виробництва, що утворюється внаслідок відділення кристалів сахарози на центрифугах під час її кристалізації.

Метаболізм – комплекс фізичних та хімічних процесів, що протікають в організмі і забезпечують його існування.

Метаболіти – продукти метаболізму.

Метод мікрокультури – метод, що базується на асептичному культивуванні поодиноких клітин у краплі рідкого поживного середовища, оточеній стерильним мінеральним маслом.

Метод плейтингу – метод, при якому суспензію поодиноких клітин змішують із розплавленим агаризованим середовищем, охолодженим до 35-40 °С, і після цього розливають тонким шаром.

Міцелій – вегетативне тіло гриба, що складається з тонких, галузистих ниток.

Мутагенез – штучне введення мутацій за допомогою фізичних і хімічних агентів.

Мутація – спонтанна або індукована зміна структури генів.

Пасаж – цикл вирощування, що починається з моменту поміщення експланту, транспланту чи інокулюму на свіже живильне середовище до наступного пересаджування.

Первинна культура – культура клітин чи тканин, виділених безпосередньо з організму.

Первинна продукція – утворення первинної (автохтонної) органічної речовини автотрофами у процесі фотосинтезу.

Періодична культура – культивування продуцентів протягом обмеженого проміжку часу.

Продуценти – автотрофні та хемотрофні організми першого трофічного рівня, які синтезують органічні речовини з мінеральних за використання сонячної енергії або енергії, що виділяється під час хімічних реакцій.

Проліферація – новоутворення клітин і тканин шляхом розмноження вже існуючих.

Протеоліз – ферментативне розщеплення білків.

Регенерація – відновлення цілісності організму із клітини, тканини чи органу.

Редиференціація – перехід спеціалізованих клітин із одного стану диференціації до іншого. Інколи цьому процесу передують поділ клітин.

Секреція – виведення речовини із клітини в зовнішнє середовище.

Селекція – відбір необхідних організмів чи клітин з необхідними ознаками у сукупній популяції.

Серотип – антигенна характеристика клітин, що ґрунтується на основі її взаємодії з антитілами.

Сібси – прямі нащадки одних і тих же батьків (тобто брати та сестри).

Соматична клітина – будь-яка нестатева клітина багатоклітинного організму.

Стовбурові клітини – мітотичноактивні клітини, за рахунок ділення яких, відбувається заміщення клітин, що загинули.

Субкультивування – процес перенесення транспланта, експланта чи інокулюму із культурального посуду на свіже живильне середовище.

Субкультура мікроорганізмів – культура мікроорганізму, одержана шляхом пасажу через відповідні повноцінні живильні середовища.

Субстрат – речовина, перетворення якої каталізується специфічним ферментом.

Суспензійна культура – вирощування окремих клітин або невеликих груп клітин у завислому стані в рідкому середовищі за постійної аерації та перемішування.

Тотипотентність – властивість рослинних соматичних клітин повністю реалізувати генетичний потенціал цілого організму.

Трансгенний організм – організм, геном якого містить чужорідний генетичний матеріал, вкраплений методами генної інженерії.

Трансгенез – уведення чужорідного гена в рослину чи тваринну клітину та його передача в ряді поколінь.

Трансплант – частина калюсної тканини, яка використовується для перенесення на свіже поживне середовище.

Чиста культура - культура, що містить тільки один вид мікроорганізмів.

Ферментація – крупномасштабне культивування мікроорганізмів у біореакторах (ферментерах) з метою отримання цільового продукту.

Фугат – рідка частина культуральної рідини, отримана після відділення біомаси.

Химера – організм, що містить клітини, тканини чи органи різних організмів.

Хромогенний субстрат – речовина, що набуває характерного забарвлення після розщеплення специфічним ферментом.

Штам – культура, що виникла після першого культивування та складається з багатьох клітинних ліній.

Шрот — твердий залишок насіння олійних культур після вилучення з нього олії екстракційним способом.

РОЗДІЛ 1. ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

Тема 1. Біотехнологічна лабораторія: структура, обладнання, умови роботи

Під час виконання робіт у біотехнологічній лабораторії потрібно ретельно дотримуватися правил техніки безпеки, які запобігають впливу на організм таких шкідливих факторів, як:

1) інфекційні агенти (віруси, бактерії тощо), які у разі потрапляння на шкіру та слизові оболонки можуть спричинити запальні процеси, а у разі проникнення в організм – інфекційні захворювання;

2) екзогенні ДНК (деякі з них можуть бути вірулентними);

3) ультрафіолетове випромінювання, що може спричинити опіки шкіри та порушення зору;

4) озон, який утворюється під дією цього випромінювання, у підвищених концентраціях, токсичний для людини;

5) їдкі, токсичні, канцерогенні та мутагенні хімічні речовини;

6) електричний струм;

7) легкозаймісті речовини та природний газ, що можуть спричинити пожежу або вибух.

Під час проведення робіт у біотехнологічній лабораторії повинно бути не менше двох осіб.

Усі роботи потрібно виконувати у спецодязі – халатах і змінному взутті. Волосся необхідно прикрити шапочкою чи косинкою. У разі потреби використовують також гумові рукавички, гумовані фартухи, маски й окуляри.

Заборонено входити до лабораторії без спецодягу.

У лабораторних приміщеннях забороняється палити, зберігати харчові продукти та вживати їжу, користуватися косметикою. Особисті речі потрібно зберігати за межами лабораторії у спеціально відведених і обладнаних місцях.

На робочому місці мають знаходитися лише потрібні для виконання конкретної роботи реактиви і матеріали, посуд, інструменти й обладнання. Посуд, призначений для зберігання реактивів, повинен мати етикетки з чіткими надписами.

Заборонено використовувати реактиви без етикеток або з нерозбірливими надписами.

Для відмірювання та набирання рідини потрібно користуватися відповідними інструментами (скляними піпетками, сеплерами тощо). При роботі з піпетками потрібно користуватися гумовою грушею або відповідним механічним пристроєм. Категорично не допускається всмоктування будь-якої рідини у піпетку ротом.

При випадковому потрапленні на лабораторний стіл чи підлогу інфекційного агента, їдкої чи токсичної речовини їх негайно усувають і обробляють забруднену поверхню у відповідний спосіб. Аналогічних заходів вживають і у разі потраплення шкідливого агента на шкіру чи слизові оболонки. За потреби належить, не зволікаючи, звернутися за медичною допомогою.

По закінченні роботи необхідно прибрати робоче місце.

На ньому не можна залишати брудний посуд, інструменти та матеріали. Якщо матеріали забруднені інфекційними агентами, то їх знезаражують розчином хлораміну. Треба також ретельно вимити руки і при необхідності обробити їх дезінфікуючим розчином.

У лабораторіях біотехнологічного та мікробіологічного профілю дезінфекційні заходи використовуються дуже широко. Закінчуючи роботу з зараженим матеріалом, проводять профілактичну дезінфекцію рук і робочого місця. Забруднені патогенним матеріалом або культурою мікробів градуйовані та пастерівські піпетки, скляні шпателі та металеві інструменти відразу після їх використання опускають у скляні банки з дезінфікуючим розчином, які знаходяться на столі біля кожного робочого місця. Обов'язковій дезінфекції підлягають також використані робочі предметні та покривні скельця, бо навіть у фіксованому та забарвленому мазку іноді зберігаються життєздатні мікроорганізми, які можуть стати джерелом внутрішньо-лабораторного зараження. Не обробляється дезінфікуючими засобами тільки той посуд, у якому вирощувалися мікроорганізми. Його складають у металеві бачки або бікси, пломбують і здають у стерилізацію.

Структура біотехнологічної лабораторії. Необхідною умовою успішного виконання робіт у біотехнологічній лабораторії є дотримання практиками певних правил та прийомів. Перш за все агенти, що використовуються для культивування, повинні бути ізольовані від материнського організму та перенесення в асептичні умови вирощування. Цим і зумовлені основні умови організації біотехнологічної лабораторії, де містяться спеціально обладнані приміщення для проведення різних етапів роботи. Лабораторія складається, як правило, з 5 – 8 кімнат, серед яких: приміщення для стерилізації середовищ, посуду та матеріалів, кімната для приготування живильних середовищ, культивацийна, лабораторна кімната, ламінарний бокс.

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

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

Перш за все, культивування фрагментів тканин і органів, а тим більше окремих клітин, вимагає дотримання повної асептики. Мікроорганізми, що можуть потрапити у живильне середовище, виділяють токсини, які інгібують ріст клітин і призводять до загибелі культури. Тому при всіх маніпуляціях з клітинами та тканинами при культивуванні *in vitro* дотримуються певних правил асептики у ламінар-боксі або в асептичних кімнатах. У першому випадку асептика досягається поданням профільтрованого стерильного повітря, що спрямоване назовні на працюючого. Асептичні кімнати стерилізують за допомогою ультрафіолетових ламп, а працюють у таких приміщеннях у стерильному одязі. Робочу поверхню столів в асептичних кімнатах та інструменти перед роботою додатково стерилізують спиртом.

На ріст і розвиток біологічних агентів *in vitro* великий вплив виявляють фізичні фактори – світло, температура, аерація,

вологість. Ізольовані клітини культивують у спеціальному приміщенні з регульованою температурою (22–28 °С). Оптимальна вологість повітря у приміщенні, де ростуть культури, повинна складати 70 – 80 %. Кімнату оснащують стелажми під освітленням люмінесцентними лампами (типу ЛБ-40, ЛД-40, ЛДЦ-40, ЛК-40). Для більшості трав'янистих рослин оптимум освітленості складає приблизно 1000 люкс. Надто низьке (300 люкс) чи високе (3000 – 10000 люкс) освітлення пригнічує ріст. Воно може впливати на метаболізм тих чи інших біохімічних сполук, що синтезуються культивованими об'єктами. Регуляція світлового режиму відбувається за допомогою реле часу, задану температуру контролюють контактними термометрами, вологість визначають психрометрами. Однак найліпше забезпечують оптимальні умови освітлення, вологості та температури кліматичні і факторостатичні камери (типу ВКШ-73).

Лабораторні приміщення оснащують усіма необхідними приладами для проведення біохімічних, гістологічних і цитогенетичних досліджень, які супроводжують основні роботи з культивування та контролю отриманих регенерантів.

Матеріали та інструменти. Оснащення лабораторії посудом та інструментами залежить від умов і обсягів робіт, що проводитимуться. Для культивування біологічних агентів необхідний відповідний набір посуду: конічні колби, мікробіологічні пробірки, чашки Петрі різного діаметру. При великому обсязі робіт можна використовувати будь-які скляні ємності, які добре миються і витримують режим стерилізації (1,5 атм, 120 °С). Для стерилізації рослинного матеріалу та його промивки використовують хімічні стакани (300 – 500 мл), які накривають чашками Петрі.

Для маніпуляцій з культурою тканин часто використовують допоміжні матеріали: вату, марлю, поліетилен, алюмінієву фольгу, обгортковий папір. Їх стерилізують в автоклаві протягом години при тиску 2 атм. Пробірки з середовищем та експлантати поміщають у штативи різних розмірів. Для перенесення посуду використовують легкі підноси.

Миття посуду. Необхідною умовою успішного культивування тканин є чисто вимитий стерильний посуд.

Найпоширеніший і надійний метод підготовки скляного посуду, особливо нового – це замочування його на 4–6 год у хромовій суміші – розчині двохромовокислого калію в концентрованій сірчаній кислоті. Після чого посуд багаторазово промивають протічною та дистильованою водою. Новий посуд рекомендується автоклавувати при тиску 1,5–2 атм 20–30 хвилин.

Брудний посуд миють детергентом, потім ретельно промивають протічною водою та ополіскують дистилатом. Чистий посуд зберігають у зачинених шафах, не допускаючи потрапляння слідів хімічних речовин.

Методи стерилізації:

1) стерилізація сухим жаром: культуральний посуд (колби, пробірки, чашки Петрі тощо) перед наповненням поживним середовищем попередньо стерилізують сухим жаром у сушильній шафі. Тривалість стерилізації: при 150 °С – 2,5 год, при 160 °С – 2 год, при 170 °С – 1 год. Треба пам'ятати, що загальна тривалість стерилізації складається з часового інтервалу, необхідного для нагрівання завантажених ємностей, та періоду власне стерилізації.

2) стерилізація сухим паром: автоклавування при 2 атм (133 °С) 30 – 40 хв у залежності від заповнення автоклаву. Таким методом стерилізують посуд, загорнутий у папір або закритий ватними тампонами. Камеру автоклаву заповнюють не більше як на 2/3 об'єму. При автоклавуванні піпеток їх верхню частину закривають ватним тампоном, після чого кожну окремо загортають у папір. Піпетки зручно стерилізувати в скляних пеналах, на дно яких, для запобігання обламування носиків піпеток, треба помістити вату. Автоклавуванням також стерилізують вату, пробки, папір, фольгу.

3) стерилізація полум'ям: даний метод найчастіше використовують для стерилізації інструментів. Їх попередньо стерилізують сухим жаром у сушильній шафі. В боксі, безпосередньо перед роботою, інструменти занурюють у фарфоровий стакан з 96 % спиртом і стерилізують обпалюванням чи прожарюванням у полум'ї спиртівки. Стерильний інструмент використовують тільки для одноразових маніпуляцій. Перед повторним використанням його треба знову

простерилізувати спиртом й обпалити.

4) **стерилізацію середовищ** можна здійснюють двома методами: автоклавуванням або пропусканням через бактеріальний фільтр. Бактеріальні фільтри існують різних діаметрів і бувають одноразового (стерильні) та багаторазового використання.

Характеристики типових мікробіологічних фільтрів

Фільтри країн СНД		Фільтри фірми „Мілліпор”		Фільтри фірми „Синпор”	
номер фільтра	діаметр пор, мкм	тип фільтра	діаметр пор, мкм	тип фільтра	діаметр пор, мкм
1	0,35	VF	0,01	1	4,0
2	0,5	VM	0,05	2	2,5
3	0,7	VC	0,10	3	1,5
4	0,9	SLGS	0,22	4	0,85
5	1,2	SLHA	0,45	5	0,60
6	3,5	DA	0,65	6	0,40
		AA	0,8	7	0,30
		RA	1,2	8	0,23
		SS	3,0	9	0,17
		SM	5,0	10	0,12

Робота у ламінарному боксі. Перед початком операцій у ламінарному боксі необхідно його підготувати до роботи. Для цього його опромінюють ультрафіолетом протягом 30 хв. Подальшу роботу можна здійснювати не раніше ніж за 20–30 хв (період, необхідний для інактивації вільних радикалів, що утворюються за дії УФ променів). Надалі здійснюють обробку поверхонь ламінарну 70–96 % етиловим спиртом. Іноді достатньо продування боксу впродовж 30 хв стерильним повітрям і протирання спиртом.

Лабораторна робота № 1

Приготування стерильного посуду та розхідних матеріалів для культивування біологічних агентів

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

Матеріали, реактиви й устаткування: колби, чашки Петрі, піпетки, термостійкі склянки, фольга, фільтрувальний папір, ватні корки.

Хід роботи

1. Обрати необхідний для подальшого культивування посуд: чашки Петрі, конічні колби, мікробіологічні пробірки. Посуд повинен бути ретельно вимитий та висушений, не допускається наявність сколів та дефектів скла.

2. Чашки Петрі ретельно замотують у два шари фольги так, щоб кінці фольги опинилися під дном чашки. Шийки конічних колб та термостійких склянок ретельно ізолюють цупкою фольгою. Культиваційні пробірки ізолюють ватними корками та замотують по 10 шт. у цупкий папір або фольгу. Таким же чином ізолюють скляні піпетки.

3. Увесь підготовлений посуд розміщують у бюкси для автоклава. Посуд стерилізують автоклавуванням при 120 °С протягом 1,5 годин.

4. По завершенню стерилізації охолодий стерильний посуд поміщують у ізольовану шафку і зберігають до заданого часу.

Висновок

Контрольні завдання та запитання:

1. Укажіть особливості організації біотехнологічної лабораторії.

2. Поясніть схему підготовки посуду та розхідних матеріалів до стерилізації.

3. Охарактеризуйте відомі Вам методи стерилізації посуду та інструментів.

4. Вкажіть правила, яких потрібно дотримуватись при роботі у біотехнологічній лабораторії.

Тема 2. Методи культивування аеробних і анаеробних мікроорганізмів

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.

Культивування аеробних мікроорганізмів. Поверхнєве культивування аеробів проводять на щільному або сипучому середовищі, а також у тонкому шарі рідкого середовища в скляному посуді із широким дном: чашка Петрі, колбах Виноградського, матрацах, кюветах. Засіяні посудини культивують при постійній температурі в термостатах або термостатних кімнатах (термокамерах). Мікроорганізми розвиваються на поверхні середовища й використовують кисень безпосередньо з повітря. На рідких середовищах облигатні аероби ростуть у вигляді рясних плівок. Факультативні аероби (анаероби) розвиваються як у товщі рідкого середовища, утворюючи суспензії, пластівці, осад, так і на поверхні у вигляді тонкої плівки. На щільних середовищах мікроорганізми ростуть у вигляді окремих колоній або суцільного газону. Поверхнєве культивування в лабораторних умовах широко застосовують для одержання накопичувальних і чистих культур, їх зберігання, вивчення морфологічних, культуральних і біохімічних ознак мікроорганізмів. У промисловості метод поверхневих культур на рідких середовищах використовують для одержання лимонної кислоти, на сипучих – для виробництва ферментних препаратів.

Глибинне культивування мікроорганізмів може бути періодичним і безперервним. При періодичному процесі весь обсяг поживного середовища засівають посівним матеріалом і вирощування ведуть в оптимальних умовах певний проміжок часу, поки не відбудеться накопичення потрібної кількості біомаси або цільового продукту. Для забезпечення росту аеробних культур у глибоких шарах рідини необхідне надходження кисню, оскільки мікробні клітини здатні

використати тільки розчинений кисень, а розчинність його невелика (4-7 мг/л). Для аерації рідких культур використовують звичайне стерильне повітря або суміш кисню, азоту й діоксиду вуглецю. Примусову аерацію часто комбінують із механічним перемішуванням. Простим і доступним способом періодичного глибинного культивування є вирощування аеробних культур у суспендованому стані в рідкому середовищі, розлитому в невеликих обсягах у пробірки або колби різної місткості, які після засівання поміщають на качалки в термокамери.

Качалки забезпечують безперервне струшування або обертання посудин частотою 100-300 об/хв. Ступінь аерації культуральної рідини регулюють зміною частоти обертання (струшування) качалки, обсягом середовища в посудинах і застосуванням спеціальних колб із 4-8 втисненими усередину відросткам – відбійниками для розбризкування рідини. Ефективність насичення середовища киснем при такому методі можна виміряти з певною погрішністю сульфїтним методом. Водний розчин сульфїту, який дорівнює обсягу поживного середовища, поміщають у колби, аналогічні колбам, які використовуються для культивування, ставлять на качалки й через певні проміжки часу вимірюють кількість окисленого сульфїту. Вирощування культур у колбах застосовують у лабораторній практиці для вивчення фізіологічних властивостей, установлення закономірностей їх росту залежно від складу компонентів середовища, з'ясування впливу факторів зовнішнього середовища на життєдіяльність клітин, визначення продуктів метаболізму.

Безперервне глибинне культивування ведуть у лабораторних ферментаторах (рис.1.). 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 витікає готова культуральна рідина. Процес безперервного вирощування у ферментаторі здійснюється за типами хемостату або турбідостату, які розрізняються способом підтримки культури в стані динамічної рівноваги.

У режимі хемостату ріст культури регулюють концентрацією фактора, що лімітує, у якості якого можуть бути використані джерела вуглецю, азоту, фосфору, ростових речовин, кисень, рН, температура. Визначення припустимих меж варіювання факторами, що лімітують, має велике значення для керування процесом безперервного культивування у виробничих умовах, дозволяє економно витратити матеріали, ефективно використати генетичні можливості продуцентів, одержувати максимальний вихід цільового продукту.

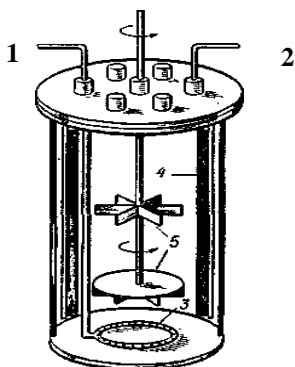


Рис. 1. Лабораторний ферментатор

- 1 – надходження повітря,
- 2 – вихід повітря,
- 3 – барботер,
- 4 – відбійник,
- 5 – мішалка

У режимі турбідостату підтримують постійну концентрацію біомаси. Застосування із цією метою збагачених живильних середовищ дозволяє мікроорганізмам розмножуватися майже з максимальною швидкістю. Однак концентрація клітин при цьому невисока. Крім того, фотометричний контроль щільності клітин вимагає застосування прозорих середовищ, що можливо здійснити лише в лабораторних умовах. Процес глибинного культивування може бути гомо- або гетерогенно- безперервним. При гомогенно-безперервному процесі у ферментаторі, де йде інтенсивне перемішування, всі параметри (концентрація поживних речовин, клітинний титр й ін.) постійні в часі. При гетерогенно-безперервному процесі застосовують кілька ферментаторів, послідовно з'єднаних між собою. Живильне середовище подається в перший ферментатор, готова культуральна рідина виходить з останнього. У цьому випадку має місце 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 при одержанні спирту й біомаси дріжджів.

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

Фізичні методи. Видалення кисню з рідкого або щільного живильного середовища безпосередньо перед засівом культури досягається кип'ятінням або прогріванням пробірок на киплячій водяній бані протягом 15-20 хв і швидким охолодженням під струменем холодної води. Після засіву, поверхню середовища, розлитого високим шаром, заливають шаром стерильної суміші вазелінової олії та парафіну. Культивування анаеробів можна вести в спеціальних пробірках, з яких після засіву відкачують повітря за допомогою вакуум-насоса (рис.2.).

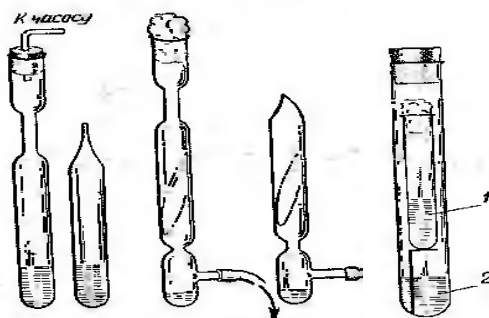


Рис. 2. Пробірки для культивування анаеробів

Залишковий тиск у пробірках за манометром не повинен перевищувати 0,0016 – 0,002 МПа. Пробірки з культурами

анаеробних мікроорганізмів, призначені для зберігання, запаюють у вузькому місці.

Вирощування анаеробів на поживному агарі в чашках Петрі або в пробірках ведуть в анаеростатах (рис. 3.).



Рис. 3. Лабораторні анаеростати

Анаеростати – це вакуумні металеві або скляні екзикатори, які добре зберігають високе розрідження протягом тривалого часу. Металевий анаеростат – циліндр з щільною герметично закритою кришкою. На кришці встановлені манометр і кран, за допомогою якого прилад приєднують до насоса. Для росту строгих анаеробів засіяні чашки або пробірки встановлюють усередині анаеростату й знижують тиск до 0,0001 МПа. Потім кран перекривають і анаеростат поміщають у термостат або термокамеру.

Іншим способом є використання скляних вакуумних екзикаторів, оснащених добре пришліфованою кришкою із краном на шліфах для відкачки повітря. Пришліфовані поверхні, щоб уникнути проникнення повітря, покривають спеціальною вакуумною змазкою. На дно екзикатора для поглинання надлишку вологи поміщають 20- 30 г хлориду натрію й 5-6 г хлориду кальцію.

Створити анаеробні умови в анаеростатах або екзикаторах також можна шляхом заміни повітря індиферентним газом (аргоном, гелієм, воднем, діоксидом вуглецю, азотом), пропущеним для стерилізації через фільтри.

Хімічні методи. Зв'язування вільного кисню, який міститься в середовищі або в посудині для культивування анаеробів, проводять за допомогою хімічних речовин. Деякі з них поміщають поза середовищем, інші вводять у якості відновника безпосередньо в поживне середовище. Хімічними поглиначами кисню є розчини пірогаллолу з Na_2CO_3 , лужний розчин гідросульфїту натрію (дитіонїту), металеве залізо й інші реактиви. Речовини, що з'єднують кисень повинні мати високу поглинаючу здатність. Наприклад, 1 мл 20 % пірогаллолу в суміші з 1 мл насиченого розчину Na_2CO_3 очищають від кисню 220 см^3 повітря. Злегка зволожені хімічні поглиначі насипають на дно більших пробірок, у які на спеціальних підставках поміщають засіяні анаеробною культурою звичайні пробірки.

Відкриті чашки Петрі із злегка зволеним пірогаллолом з содою або гідросульфїтом натрію ставлять на дно ексикатора. Заповнений засіяними чашками прилад герметично закривають кришкою, більші пробірки – гумовими пробками й поміщають у термостат.

Хімічним способом видаляють залишки кисню у вакуум-ексикаторах і анаеростатах, з яких частково викачане повітря. Відсутність кисню у приладах контролюють за допомогою індикатора. Готують 0,015 % водний розчин метиленового синього й 0,5% розчин глюкози, рН якого доводять до 10 розчином соди (Na_2CO_3). Рівні обсяги розчинів змішують перед тим, як ставити в анаеростат. Знебарвлення розчину відбувається при тиску менше 0,005 МПа. У якості відновлювача, що додають у живильне середовища для культивування анаеробів, використовують органічні й неорганічні речовини: редукуючі цукри (глюкоза), речовини із сульфгідрильною групою (цистеїн, глутатіон), аскорбінову кислоту, пірокатехін, мурашинокислий натрій, сульфїди, сірководень, гідросульфїт натрію, цитрат титану, а також деякі складні компоненти – пептон, шматочки печінки, м'язів, картоплі, ячного білка.

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

мікроорганізми енергійно поглинають кисень, виділяють CO_2 і створюють умови для росту анаеробів. Спільне вирощування симбіотичних видів аеробів й анаеробів ведуть на поверхні щільного середовища за методом Фортнера. У чашки Петрі товстим шаром наливають кров'яний агар. Після застигання середовища стерильним пінцетом по діаметру чашки вирізують лунки шириною 4-6 мм. Одну половинку агарової пластинки засівають культурою аеробів (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*), іншу – культурою анаеробів. Щоб припинити доступ кисню в чашку, щілину між дном і кришкою замазують парафіном, воском або пластиліном. Чашки поміщують у термостат. Спочатку розвивається аеробний мікроорганізм. Коли зростаючі клітини поглинуть із чашки весь кисень, починається ріст анаеробів.

Спільне вирощування аеробів та анаеробів можна проводити в умовах спільного культивацийного посуду (рис. 4.).

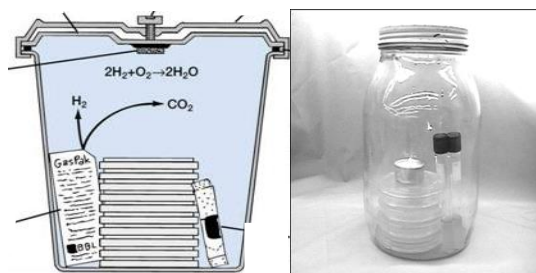


Рис. 4. Створення анаеробних умов культивування

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

Лабораторна робота № 2 Культиування аеробних мікроорганізмів

Мета заняття: оволодіння прийомами та методами культивування мікроорганізмів в аеробних умовах.

Матеріали, реактиви й устаткування: колби, чашки Петрі, піпетки, колбострушувач, термостат, предметні та

покровні скельця, набір для фарбування, спирт, сухе пальне, мікроскоп, живильні середовища, культура мікроорганізмів.

Хід роботи

1. Підготувати стерильний посуд, у якому відбуватиметься культивування.

2. Підготувати різні види живильного середовища: рідке – поживний бульйон та щільне – поживний агар. Стерильне середовище розлити у підготовлений стерильний посуд (пробірки, колби, чашки Петрі).

3. Провести засів живильного середовища культурою аеробних мікроорганізмів (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina flava*).

4. Колби поставити в колбострушувач, а чашки Петрі – в термостат.

5. Через добу провести огляд колб і чашок та підрахувати кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) на площу поверхні чашки Петрі. Усі спостереження занести в лабораторний журнал.

6. Повторні огляди провести на 2-гу та 3-тю доби.

Об'єкт	КУО (1 доба)	КУО (2 доба)	КУО (3 доба)
<i>B. subtilis</i>			
<i>B. megaterium</i>			
<i>S. flava</i>			

Висновок _____

Контрольні завдання та запитання:

1. Якими способами можна проводити культивування мікроорганізмів ?
2. Наведіть приклади рідких та щільних живильних середовищ.
3. Назвіть переваги та недоліки поверхневого та глибинного культивування мікроорганізмів.
4. У чому різниця між гомо- та гетерогенно- безперервним культивуванням ?
5. Поясніть чи можливе глибинне культивування у твердому середовищі та поверхнєве культивування на рідкому середовищі.

Лабораторна робота № 3

Способи культивування анаеробних мікроорганізмів

Мета заняття: оволодіння прийомами та методами культивування мікроорганізмів у анаеробних умовах.

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

Хід роботи

1. Підготувати стерильний посуд, у якому відбуватиметься культивування.
2. Приготувати живильне середовище (рідке та щільне), простерилізувати та стерильно розлити в посуд. Рідке середовище розлити в пробірки, щільне в пробірки та чашки Петрі. Одну пробірку зі щільним середовищем розмістити під кутом для застигання.
3. Провести засів живильного середовища культурою анаеробних мікроорганізмів (*Lactobacillus acidophilus*, *Lb. plantarum*).
 - а) Дві пробірки (з рідким і щільним середовищами) помістити в анаеростат, у якому розміщено киснепоглинач.
 - б) Чашки Петрі, краї яких змазані парафіном, помістити в термостат.

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

4. Через добу провести огляд пробірок і чашок. Усі результати спостереження необхідно занести в лабораторний журнал. Повторні огляди необхідно повторити на 2-гу та 3-тю доби.

Культивування в анаеростаті _____

Культивування в ізольованих парафіном чашках Петрі

Культивування під шаром вазелінової олії _____

Контрольні завдання та запитання:

1. Якими способами можна створити анаеробні умови для вирощування мікроорганізмів?

2. Укажіть прилади, які застосовують для культивування анаеробів.

3. Поясніть принципи біологічних методів культивування анаеробних мікроорганізмів.

4. Поясніть принципи хімічних та фізичних методів культивування анаеробів.

Тема 3. Отримання чистих культур мікроорганізмів – як основний етап створення штамів-продуцентів

Сучасне біотехнологічне виробництво неможливе без використання мікроорганізмів, здатних синтезувати промислово важливі цільові продукти. Останніми роками їх широко застосовують як об'єкти генетичної інженерії для клонування генів і створення генетичних векторів, експресії гетерологічних білків.

Початковим і надзвичайно важливим етапом біотехнологічного процесу, незалежно від природи продуцентів, є отримання їхніх чистих культур. В основі цих методів лежить принцип Р. Коха, згідно з яким чисту культуру можна виділити з окремої колонії (клубу). Клон – це генетично однорідне потомство, отримане розмноженням однієї клітини. Метод Р. Коха можна використовувати лише для тих мікроорганізмів, які здатні рости на твердих живильних середовищах. Окремі колонії отримують розрідженням висіванням бактерій на тверде живильне середовище. Для цього застосовують кілька методів.

Метод розведень – передбачає приготування розведеної суспензії мікроорганізмів і висівання її у чашки Петрі на тверде живильне середовище (рис. 5.).

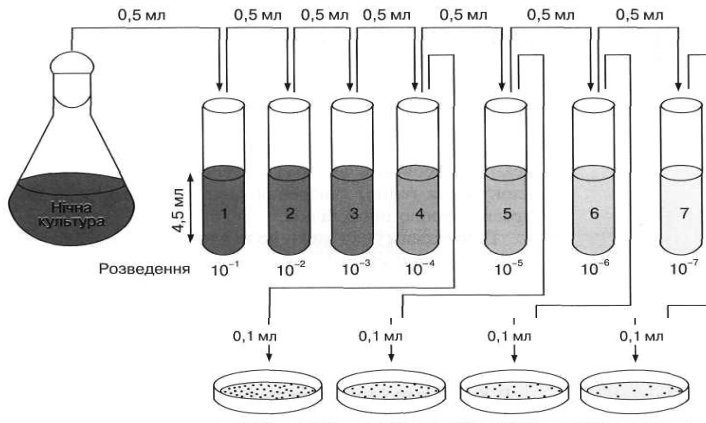


Рис. 5. Схематичне пояснення методу серійних розведень

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 10^9 клітин в 1 мл. Тому для отримання потрібної густини посіву треба взяти близько 0,0002 мкл культури. Оскільки практично 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, при якому 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 при цьому знижується точність розведення. Ступінь розведення залежить від густоти досліджуваної популяції мікроорганізмів, вона тим більше, чим більше густина вихідної бактерійної культури. Зазвичай виконують 6-7 розведень і оскільки точна концентрація бактерій в 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, потомки однієї бактерійної клітини утворюють компактну колонію, видиму неозброєним оком. За умов розрідженого посіву такі колонії не контактуватимуть між собою. 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" дозволяє на основі кількості колоній, що вирости 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).

Для одержання окремих клонів бактерій часто застосовують

інший прийом – метод виснажувального штриха .

Метод виснажувального штриха ґрунтується на поступовому зменшенні густоти посіву шляхом розтирання суспензії мікроорганізмів по поверхні твердого середовища (рис. 6).

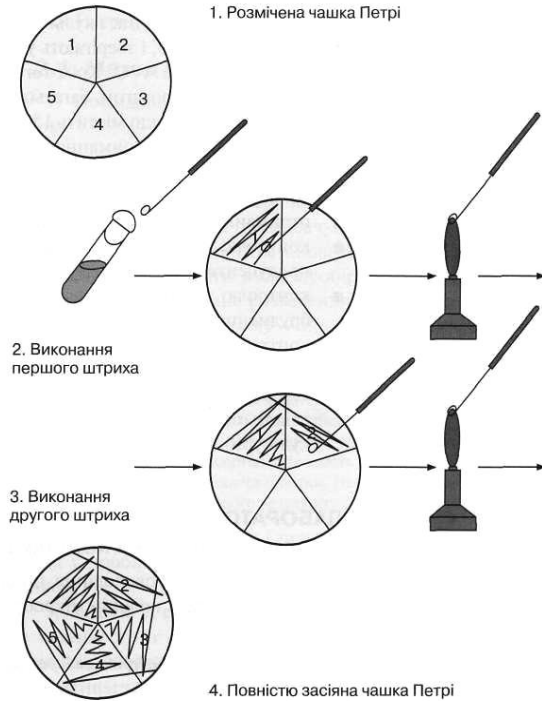


Рис. 6. Техніка нанесення виснажувального штриха (за Маніатисом)

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 їхніх 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 при подальшому пересіванні 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 (рис. 7.).

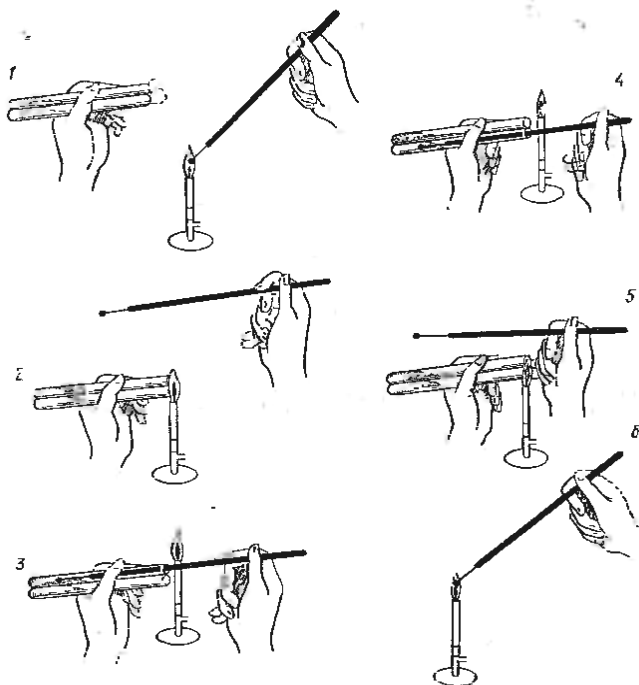


Рис. 7. Пересів культури мікроорганізмів

Колонії більшості бактерійних штамів можна зберігати впродовж кількох тижнів на поверхні агаризованого середовища, якщо чашки Петрі ретельно заклеїти парафіномом і тримати за температури 4°C. 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 з культурою, щоб живильне середовище не підсихало, і зберігають у темряві при

кімнатній температурі або при 4°C. Крім того, бактерійні культури можна зберігати протягом багатьох років при -70 °C у рідкому середовищі, що містить розчин 15 % гліцерину.

Наведені методи отримання окремих колоній широко застосовують для:

- кількісного обліку мікроорганізмів;
- отримання нових штамів мікроорганізмів;
- контролю генетичної однорідності та якості штаму-продуцента;
- контролю звичайної та перехресної контамінації (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).

Лабораторна робота № 4

Отримання окремих колоній мікроорганізмів методом серійних розведень

Мета заняття: оволодіння прийомами та методами отримання окремих колоній мікроорганізмів і кількісного аналізу культур.

Матеріали, реактиви й устаткування: бактеріологічна петля, скляний шпатель Дригальського, градуйовані піпетки або самплер і стерильні наконечники до нього, стерильні пробірки, спиртівка або інше джерело відкритого полум'я, водяна баня ($t = 47\text{ }^{\circ}\text{C}$) з качалкою, рідке та тверде поживне середовище Лурія-Бертані (LB), стерильний фізіологічний розчин (0,9 % NaCl) або стерильний натрієво-фосфатний буфер (pH 7,4), нічна культура бактерії, маркер.

Хід роботи

Для проведення роботи заздалегідь готують чашки Петрі з твердим живильним середовищем (1,5 % агару) та пробірки з 3 мл стерильного середовища LB з додаванням 0,6 % агару.

Метод розведень

1. Послідовно пронумерувати сім стерильних пробірок.
2. У кожному з них стерильно внести по 4,5 мл фізіологічного розчину або натрієво-фосфатного буфера.
3. У пробірку №1 стерильно внести 0,5 мл нічної культури бактерій (передбачувана концентрація вихідної бактерійної суспензії становить близько 10^9 кл/мл) та ретельно перемішати вміст пробірки, прокручуючи її між долонями. Отримане розведення становитиме 10^{-1} , а концентрація клітин у ньому – приблизно 10^8 кл/мл.
4. Із вмісту пробірки № 1 приготувати наступне розведення у пробірці № 2, повторюючи описані в п.3 маніпуляції.
5. За тією ж схемою приготувати решту розведень аж до останнього в пробірці № 7. Передбачувані концентрації клітин у кожному розведенні наведено в таблиці

Номер пробірки	Розведення	Передбачувана концентрація клітин в 1 мл
1	10^{-1}	10^8
2	10^{-2}	10^7
3	10^{-3}	10^6
4	10^{-4}	10^5
5	10^{-5}	10^4
6	10^{-6}	10^3
7	10^{-7}	10^2

6. Висіяти в чашку Петрі з твердим поживним середовищем LB два-три останні розведення. Причому з кожного розведення зробити 2–4 паралельні висіви. Висіви можна здійснювати однією піпеткою, але починати треба обов'язково з більшого розведення. Кожне з розведень висівають в окрему чашку, застосовуючи один з наведених нижче методів.

Висівання культури глибинним методом.

1. У пробірку з 2-3 мл середовища з 0,6 % агару, розплавленого і охолодженого до 47-50 °С (температуру підтримують за допомогою водяної бані) внести 0,1 мл бактерійної суспензії одного з вищезазначених розведень. Вміст

пробірки старанно перемішати, прокручуючи її між долонями, та за стерильних умов вилити в центр заздалегідь приготовленої чашки Петрі з твердим поживним середовищем (нижній агар).

2. Рівномірно розподілити м'який агар по поверхні нижнього агару, акуратно обертаючи чашку Петрі по поверхні столу. Закрити чашку та надписати її. Залишити чашку при кімнатній температурі до повного застигання верхнього агару. Таким же чином висіяти в другу чашку бактерійну суспензію з іншого розведення.

Висівання культури поверхневим методом.

1. Нанести за стерильних умов у центр заздалегідь приготовленої чашки Петрі з твердим поживним середовищем (1,5 % агару) 0,1 мл бактерійної суспензії з одного з розведень. За допомогою стерильного скляного шпателя Дригальського обережно розподілити суспензію по поверхні середовища і втерти її в поверхню агару так, щоб та стала сухою. Закрити чашку та надписати її. Таким же чином висіяти в другу чашку Петрі суспензію з іншого розведення. Для кожного розведення застосовують новий стерильний шпатель.

2. Закриті чашки Петрі перевернути, щоб конденсаційна вода, утворена на кришці при застиганні агару, не завадила отримати ізольовані колонії, та інкубувати їх у термостаті 16-24 год за температури 37 °С.

3. Для подальших робіт потрібно вибрати таку чашку Петрі, щоб колонії в ній були чітко відокремлені одна від одної і щоб їхня кількість не була занадто малою, а становила від 30-50 до 100-150.

Для визначення титру вихідної культури застосовують формулу:

$$\text{Титр} = \text{Концентрація клітин (кл/мл)} =$$

$$\frac{\text{Кількість колоній у чашці Петрі}}{\text{Об'єм проби, висіяний у чашку Петрі} \times \text{Розведення} (10^n)}$$

$$\text{Об'єм проби, висіяний у чашку Петрі} \times \text{Розведення} (10^n)$$

Висновок _____

Контрольні завдання та запитання:

1. Дайте визначення термінів «чиста культура», «клон».
2. Поясніть принцип методу Р.Коха для отримання чистих культур штамів-продуцентів.
3. Опишіть порядок виконання методу серійних розведень для отримання чистих культур.
4. Опишіть порядок виконання методу виснажувального штриха для отримання колоній мікроорганізмів.
5. Які практичні аспекти застосування різних методів отримання чистих культур мікроорганізмів-продуцентів ?

Лабораторна робота № 5

Отримання окремих колоній мікроорганізмів методом виснажувального штриха

Мета заняття: оволодіння прийомами та методами отримання окремих колоній мікроорганізмів та кількісного аналізу культур.

Матеріали, реактиви й устаткування: бактеріологічна петля, скляний шпатель Дригальського, стерильні піпетки та пробірки, водяна баня ($t = 47\text{ }^{\circ}\text{C}$) з качалкою, рідке та тверде живильне середовище Лурія-Бертані (LB), стерильний розчин 0,9 % NaCl або стерильний натрієво-фосфатний буфер (pH 7,4), нічна культура бактерії, маркер.

Хід роботи

Метод виснажувального штриха за Маніатисом

1. Розмітити за допомогою маркера зовнішню поверхню дна чашки Петрі на 5–6 секторів та пронумерувати їх. Усі подальші етапи роботи проводять у стерильних умовах.
2. Простерилізувати бактеріологічну петлю у відкритому

полум'ї та охолодити її, зануривши у стерильне агаризоване середовище у чашці Петрі. Занурити петлю в колбу з вихідною культурою бактерій *E. coli* і в першому секторі нанести петлею хвилястий штрих перпендикулярно до радіуса чашки (перший штрих).

3. Простерилізувати й охолодити петлю. Перпендикулярно до одного з кінців першого штриха нанести штрих у секторі 2 (другий штрих).

4. Простерилізувати й охолодити петлю. Таким же чином нанести штрихи у 3-, 4- і 5-му секторах, кожний раз стерилізуючи та охолоджуючи петлю.

Метод виснажувального штриха за Міллером

1. Виконати пункти 1–3 наведеного вище методу.

2. Петлею з вихідною бактерійною культурою послідовно нанести окремі штрихи у секторах, не стерилізуючи петлю.

3. Після посіву культури *E. coli* чашки перевернути та інкубувати у термостаті протягом 16–24 год за температури 37 °С.

Результати експерименту

І. Визначити титр (кл/мл) вихідної культури, використавши результати посіву бактерійної суспензії поверхневим та глибинним способами. Провести статистичну обробку отриманих даних.

Для цього необхідно:

1. Підрахувати кількість колоній у чашці Петрі, що виростили після посіву 0,1 мл суспензії із розведення 10^{-7} (x_1); 10^{-6} (x_2); 10^{-5} (x_3).

Місце для розрахунків _____

2. Враховуючи, що кожна життєздатна клітина, розмножившись, утворює окрему колонію, можна визначити титр вихідної бактерійної суспензії (кл/мл).

Результати кількісного дослідження бактерійної культури й отримання її клонів

№ п/ п	розведення	Метод розведення				Метод виснажувального штриха	
		глибинний		поверхневий		За Міллером	за Маніатисом
		КУО 0,1 мл	КУО 1 мл	КУО 0,1 мл	КУО 1 мл		
1	10^{-5}					-	-
2	10^{-6}					-	-
3	10^{-7}					-	-
4	Вихідна бактерійна культура	-	-	-	-		

II. Оцінити ефективність різних варіантів методу виснажувального штриха.

Висновок

Контрольні завдання та запитання:

1. Поясніть значення кількісного обліку мікроорганізмів і прийомів отримання клонів мікроорганізмів у біотехнологічній практиці.

2. Опишіть принцип методу розведень. Поясніть, з якою метою його застосовують у виробництві та лабораторних дослідженнях.

3. Охарактеризуйте різні підходи щодо виконання методу виснажувального штриха.

4. Назвіть особливості методів зберігання бактерійних культур.

Тема. 4. Визначення параметрів культивування біологічних агентів

Основними параметрами росту будь-якого біологічного агента є біомаса, швидкість росту та тривалість лаг-фази (у разі, якщо ріст періодичної культури аналізують за збільшенням біомаси, а не за кількістю клітин).

Біомаса – клітинна маса, що утворюється в процесі вирощування організмів.

Визначення біомаси складається із трьох послідовних операцій: доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення, відділення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини, визначення їх маси.

Найчастіше визначають масу сухих клітин, хоча іноді можна обмежитися визначенням сирової біомаси. В останньому випадку перший етап відпадає; досить тільки зважити центрифужну пробірку (фільтр), але не доводити її масу до постійного значення. Біомасу зазвичай виражають у грамах або міліграмах на літр культуральної рідини.

Культуральна рідина – складна колоїдна система, суміш живильного середовища, культури мікроорганізмів, продуктів життєдіяльності та відпрацьованих газів. **Фугат** – рідка частина культуральної рідини, отримана після відділення біомаси.

Відділення мікроорганізмів від середовища можливо центрифугуванням або фільтруванням.

Центрифугуванням відокремлюють зазвичай бактерії. Для цього в центрифужну пробірку наливають точно виміряний обсяг ретельно перемішаної рідкої культури, що залежно від її щільності коливається від 5 до 20 мл. Час центрифугування й число оборотів залежать від розмірів клітин. Чим вони менші, тим більше потрібно оборотів і тем тривалішим повинен бути час центрифугування. Найчастіше центрифугують 15-20 хв при 5-10 тис. обертів за хв. Після центрифугування надосадову рідину обережно зливають, осад промивають злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на 1 л води) і знову центрифугують при тій же кількості обертів. Супернатант зливають негайно після зупинки центрифуги, інакше частина осаду може бути втрачена.

Мицелій актиноміцетів і грибів відокремлюють фільтруванням. Паперовий фільтр поміщають у скляну лійку й фільтрують через нього точно виміряний обсяг культури, від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою. Для відділення бактерій використовують мембранні фільтри. Розміри пор мембранного фільтра повинні бути менші від величини клітин, біомасу яких визначають. Мембранний фільтр поміщають на пористу пластинку спеціального держателя, вставленого в колбу. Щоб прискорити фільтрування, колбу під'єднують до водострумного насоса. Осад кілька разів промивають підкисленою дистильованою водою.

Біомасу зі твердого середовища знімають шпателем або склянню паличкою. Для кращого результату на поверхню середовища можна внести 5-10 мл дистильованої води або фізіологічного розчину. Об'єднану біомасу переносять у центрифужну пробірку або на фільтр (залежно від морфологічних особливостей культури).

Окрім вагових та кінетичних параметрів оцінки стану культур біологічних агентів також застосовують методи оцінки кількості та якості цільового продукту.

Лабораторна робота №6 ***Визначення біомаси зважуванням***

Мета заняття: засвоєння методики визначення біомаси мікроорганізмів ваговим методом.

Матеріали, реактиви й устаткування: чашки Петрі з культурою мікроорганізмів, культуральна рідина з деякою невизначеною концентрацією мікроорганізмів, фільтри, центрифужні пробірки, чашки Петрі, центрифуга, аналітичні ваги, сушильна шафа, ексикатор.

Хід роботи

1. З поверхні щільного поживного середовища чашок Петрі провести змив культури мікроорганізмів 10 мл дистильованої води. Провести спробу фільтрування змивів через попередньо зважений паперовий фільтр. Оцінити ефективність фільтрування

і можливість відділення біомаси. Отримані результати занести в таблицю. Провести розрахунок кількості отриманої біомаси.

Параметри	Показник
Маса самого фільтра x_1	
Маса фільтра із біомасою x_2	
Біомаса $x = x_2 - x_1$	

2. Із колби в зважену центрифужну пробірку налити 5 мл ретельно перемішаної суспензійної культури. Зважити пробірку з культуральною рідиною. Провести центрифугування при 3000 об/хв. протягом 15 хв.

3. Фугат злити. Осад промити підкисленою водою і пробірки знову центрифугувати протягом 10 хв при 3000 об/хв.

4. Масу культури визначити за формулою:

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

M - суха біомаса в г/л;

A - маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом у г;

B - маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду в г;

V - обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування

Висновок

Контрольні завдання та запитання:

1. Поясніть значення термінів «культуральна рідина», «фугат», «біомаса».

2. Вкажіть можливі підходи до процесу відділення біомаси з культуральної рідини.

3. У яких випадках для відділення біомаси можна застосовувати фільтрування?

4. Поясніть як знімають біомасу із поверхні твердого середовища.

Лабораторна робота №7 **Встановлення характеру росту досліджуваних культур**

Мета заняття: ознайомлення з циклом розвитку мікробних культур і специфікою фаз росту періодичної культури.

Матеріали, реактиви й устаткування: культура *Pseudomonas sp.*; стерильний розчин базового фосфатного буфера для середовища; стерильні розчини мікроелементів, шпателі, мірний посуд, піпетки, колби для вирощування бактерій, гумові пробки з мікробіологічними фільтрами.

Хід роботи

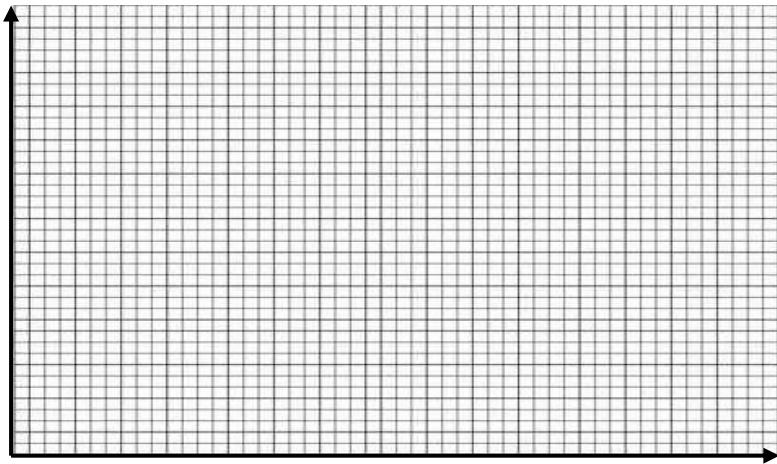
1. Приготувати живильне середовище для вирощування бактерій: в мікробіологічному боксі до 0,5 л основного середовища (фосфатний буфер) в стерильних умовах над спиртівкою додати 2,5 мл стандартного розчину заліза, 1,5 мл розчину мікроелементів, 2 мл розчину сульфату магнію і необхідний об'єм розчину хлориду амонію (в 1 мл якого затримується 100 мг солі); вуглецевий субстрат (з розрахунку 10 г/л фруктози). Інокулят розлити в 10 ферментаційних колб по 100 мл (наприклад, 1а, 1б, 1в і т. д.). Виміряти вихідну оптичну густину (ОГ) культури.

2. Періодично (через 12 годин) проводити відбір проб для вимірювання оптичної щільності культури на ФЕК і мікроскопіювання клітин. За результатами виконання завдань заповнити таблицю:

**Показники росту культури *Pseudomonas sp.*
за періодичних умов культивування**

Група	Вихідні показники інокуляту		Поточні показники культури	
	ОГ	X, г/л	ОГ	X, г/л
Час від початку дослід. год.				

3. За результатами експерименту побудувати криву росту культури *Pseudomonas sp.* за накопиченням біомаси в культурі.



Висновок _____

Контрольні завдання та запитання:

1. Вкажіть основні фази кривої росту біологічних агентів, які застосовуються в біотехнологічних процесах.
2. Чим зумовлена тривалість кожної з фаз кривої росту? Вкажіть лімітуючі фактори для кожної з фаз.
3. Вкажіть відмінності кривої росту при періодичному та безперервному культивуванні продуцентів.
4. Охарактеризуйте проміжні типи культивування біологічних агентів: продовжене періодичне, твердорідинне та діалізне культивування.

Лабораторна робота №8

Вивчення можливості утворення цільового продукту: вироблення електричного струму мікроорганізмами

Мета заняття: ознайомлення з методом культивування дріжджів; визначити силу струму, що генерується дріжджовими клітинами.

Матеріали, реактиви й устаткування: сухі дріжджі, сахароза, K_2HPO_4 , хімічні стакани, П-подібна трубка, вугільні електроди, мікроамперметр, акваріумний аератор.

Хід роботи

1. Приготувати живильне середовище:
 - а) послідовно розчинити речовин у воді в концентраціях: сахароза 8-10%, азот 0,04% (в перерахунку на (NaNH_4) 2804 – 1,88г на 100 мл розчину); фосфор - 0,05% (в перерахунку на K_2HPO_4 – 2,0 г на 100 мл розчину). рН середовища 4,5-5,0.
 - б) до підігрітого до 35 – 37 °С розчину додати сухі дріжджі з розрахунку 5% від маси розчину.
2. Живильне середовище з дріжджовими клітинами помістити в термостат при температурі +35 -+37°С і витримати для росту і розмноження культури протягом 24 год. при постійній аерації повітрям з швидкістю 10-20 мл/хв. (використовувати акваріумний аератор). Підтримувати культуру дріжджів щоденним внесенням нагрітого живильного середовища в об'ємі 20-30 мл на 200-250 мл вихідного об'єму.
3. Приготувати два хімічних стакани, в одному з яких

знаходиться інкубована культура, а в іншому – живильне середовище без культури. Розчини в стаканах з'єднати за допомогою електролітичного ключа (П-подібна трубка, заповнена насиченим розчином КСІ, із закритими ватними тампонами отворами). Два вугільних електроди за допомогою провідників з'єднати з мікроамперметром і занурити: один – в стакан з культурою дріжджів, а інший – у стакан з чистим середовищем.

4. Спостерігати за відхилення стрілки приладу від нульової позначки. Зареєструвати величину сили струму. Дослідження повторити тричі та визначити середній показник сили струму, що генерується дріжджовими клітинами.

5. Зробити висновок про електрогенеруючу здатність мікроорганізмів.

Висновок _____

Контрольні завдання та запитання:

1. Охарактеризуйте хімічні принципи отримання етанолу та біогазу.
2. Вкажіть принципи біотехнології одержання етанолу з крохмалю та целюлози.
3. Укажіть принципи біотехнології одержання біогазу.
4. Поясніть принципи фотохімічного та біоелектричного одержання енергії.
5. Поясніть принцип методу визначення електрогенеруючої здатності мікроорганізмів.

Тема 5. Вивчення біологічної активності біотехнологічних препаратів

За обсягами щорічного виробництва перше місце серед біотехнологічної продукції посягають антибіотики.

Антибіотики – спеціальні продукти життєдіяльності мікроорганізмів і їхньої модифікації, що володіють високою фізіологічною активністю стосовно визначених груп мікроорганізмів (вірусів, бактерій, грибків, водоростей) чи до злоякісних пухлин. Поява терміна пов'язана з отриманням і впровадженням у практику нового хіміопрепарату пеніциліну, активність якого у відношенні до патогенних коків і деяких інших бактерій значно перевищувала дію сульфаніламідів. Як правило, антибіотики виділяють з живих бактерій або грибів. Існує також велика кількість синтетичних антибіотиків, які відрізняються модифікаціями функціональних груп природних антибіотиків. Такі модифіковані сполуки часто ефективніші, або стійкіші до нейтралізації, яка є наслідком набутої мікроорганізмами резистентності.

За хімічною структурою антибіотики об'єднують різноманітні групи сполук. Зокрема, сполуки, що блокують біосинтез білка на рибосомах; сполуки, що утворюють іонно-проникні канали у плазматичній мембрані, та ін. Характерною особливістю антибіотиків є їхня здатність порушувати певні ланки обміну речовин мікроорганізмів або дію деяких їхніх ферментів.

Різними методами сьогодні одержано біля 6 тис. антибіотиків. Але з них використовується лише близько 100. При цьому існують високі вимоги до антибіотиків:

- а) відсутність або низький рівень токсичності;
- б) виражений антимікробний ефект в умовах організму;
- в) повільний розвиток стійкості (привикання) хвороботворних бактерій до антибіотика;
- г) розчинність у воді, стабільність у звичайних умовах зберігання протягом тривалого часу;
- д) збереження антимікробної дії в умовах середовища фізіологічних рідин і тканин організму.

Кожен антибіотик має визначений антимікробний спектр дії,

що відповідає числу чутливих до нього видів мікроорганізмів. Умовно розрізняють антибіотики широкого і вузького спектру дії. Відмінності в діапазоні спектра визначаються особливостями механізму дії антибіотиків. За типом переважаючої дії, антибіотики поділяються на бактеріостатичні (пригнічують ріст і розмноження мікробів) та бактерицидні (спричиняють загибель мікроорганізмів). Необхідно пам'ятати, що лише антибіотики бактерицидної групи вбивають мікроорганізми в організмі тварин.

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків та інших хіміопрепаратів визначають двома групами методів: дискодифузним (метод дифузії в агар із застосуванням паперових дисків з антибіотиками) та методом розведень антибіотика в щільному або рідкому живильному середовищі. Дискодифузний метод слід розглядати як якісний. Завдяки простоті виконання він є основним для практичних лабораторій. Метод розведення – найточніший кількісний спосіб. Його застосовують в особливо важливих практичних випадках і в науково-дослідній роботі.

Незважаючи на бурхливий розвиток синтетичних лікарських препаратів і антибіотиків, лікарські рослини продовжують займати значне місце в арсеналі лікувальних засобів. Профілактика та лікування інфекцій і надалі є однією з складних і актуальних проблем сучасної медицини. Широке використання антибіотиків призвело до формування у мікроорганізмів антибіотико-резистентності. Також до небажаних і водночас, поширених наслідків антибіотикотерапії відносяться алергічні реакції та прямий токсичний антибактеріальний вплив препаратів на макроорганізм. Тож є всі підстави для пошуку нових джерел протимікробних засобів, одними із яких можуть бути екстракти лікарських рослин.

Застосування антимікробних засобів рослинного походження поряд із синтетичними препаратами, такими як антибіотики, фторхінолони, антисептики, що у порівнянні мають сильнішу активність, зумовлене низькою токсичністю, можливістю тривалого застосування, більшою доступністю та здатністю до біодеградації. До переваг рослинних засобів відносять також відсутність розвитку дисбактеріозів та

алергічних реакцій.

До природних біологічно активних речовин (БАР), що мають протимікробну дію, належать рослинні антибіотики, фітонциди, ефірні олії, бальзами, смоли, дубильні речовини, органічні кислоти, алкалоїди, глікозиди. Всі вони утворюються під час життєдіяльності різних груп рослин від найпростіших до вищих рослин з метою самозахисту живих тканин від розмноження в них мікроорганізмів. Потрапляючи в організм людини, вони активно діють проти бактерій, небезпечних для здоров'я (стафілококів, стрептококів, мікобактерій туберкульозу).

Антибіотичні речовини із вищих рослин розрізняються між собою за спектром антибіотичної дії. Серед них є речовини, які володіють широким або більш вузьким спектром. На грам-негативні бактерії діють антибіотики переважно широкого спектра (аліцин, протоанемонін). Багато антибіотиків із вищих рослин вибірково діє на гриби, причому антифунгальні властивості в одних із антибіотиків проявляються відносно дерматофітів, а в інших – фітопатогенних грибів або сапрофітів.

Лабораторна робота № 9 **Дослідження біологічної активності деяких** **антибіотиків методом дифузії**

Мета заняття: оволодіти методикою дослідження біологічної дії на мікроорганізми антибіотиків: еритроміцину, канаміцину, левоміцину, оксциліну, стрептоміцину.

Матеріали, реактиви й устаткування: очищене від сухожиль м'ясо, NaHCO_3 , агар або желатина, антибіотики: еритроміцин, канаміцин, левоміцитин, оксцилін, стрептоміцин, водяна баня, фільтрувальний папір, ватні пробки.

Хід роботи

Приготування живильного середовища

1. 500 г очищеного від сухожиль м'яса залити 500 мл води і прокип'ятити протягом 2-х годин. Одержаний бульйон відфільтрувати через вату і довести рН до значення 7,2-7,4 додаванням по краплинах 10% розчину NaHCO_3 .

2. У чисті, попередньо простерилізовані гарячою парою колби

на 250 мл розлити бульйон, закрити ватними пробками та стерилізувати на кип'ячій водянній бані протягом 30 хв. Після охолодження стерилізацію повторити.

в) Одну колбу з бульйоном відкрити і поставити в термостат на добу при температурі 25-30°C. При цьому відбудеться зараження живильного середовища мікроорганізмами із повітря (бульйон помітно мутніє). Одержану в такий спосіб добову культуру пізніше використати як посівний матеріал.

г) До другої частини бульйону додати агар або желатин (на 250 мл бульйону 5 г) і нагріти на водянній бані до повного їх розчинення. Розчин профільтрувати через складчастий фільтр і знову стерилізувати протягом 20 хв. у колбі з ватним корком.

Вирощування мікроорганізмів

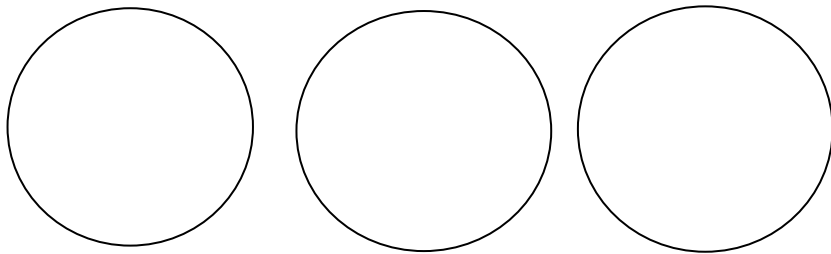
1. У стерильні чашки Петрі, розміщені на горизонтальній поверхні, налити по 20 мл розплавленого м'ясо-пептонного агару, залишити до повного охолодження та загустіння.

2. На підсушену поверхню поживного середовища засіяти досліджуваний матеріал: в кожную чашку Петрі налити по 1 мл добової бульйонної культури.

3. На поверхню засіяного агару пінцетом накласти диски з фільтрувального паперу діаметром 4-5 мм, просочені різними антибіотиками (4-5 дисків в одну чашку);

4. Закрити чашки Петрі і помістити їх у термостат при +36°C. Протягом наступних днів спостерігати за ростом мікроорганізмів.

5. Через тиждень за діаметром дисків, що не заросли мікроорганізмами, зробити висновок про чутливість мікроорганізмів до антибіотиків. Вигляд чашки Петрі замалювати у робочий зошит.



Виміряти діаметр зон лізису навколо кожного диска і визначити ступінь чутливості культури за діаметром зони затримки росту:

- а) більше 25 мм - культура високочутлива;
- б) від 15 до 25 - чутлива;
- в) від 10 до 14 - малочутлива;
- г) менше 10 мм і повна відсутність - стійка.

Чим чутливіші мікроорганізми до препарату, тим ширша навколо диска зона відсутності росту мікроорганізму (стерильна зона). В подальшому вибирають таку концентрацію препарату, яка дає найширшу зону, тобто діє найефективніше.

Препарат антибіотику	Діаметр зони затримки росту	Ступінь чутливості

Висновок

Контрольні завдання та запитання:

1. Охарактеризуйте методи аналізу антимікробної дії хіміопрепаратів.
2. Опишіть принцип методу дифузії в агар для встановлення антимікробної дії хіміопрепаратів.
3. Опишіть принцип методу серійних розведень для встановлення антимікробної дії досліджуваних сполук.
4. Поясніть, як проводиться оцінка чутливості мікроорганізмів до дії досліджуваних препаратів.
5. Вкажіть причини необхідності пошуку нових протимікробних препаратів.

Лабораторна робота № 10

Скринінгове дослідження антимікробної активності рослинних екстрактів

Мета заняття: оволодіння прийомами та методами скринінгове дослідження антимікробної дії рослинних екстрактів

Матеріали, реактиви й устаткування: бактеріологічна петля, скляний шпатель Дригальського, стерильні склянні трубки, сепер і стерильні наконечники до нього, стерильні пробірки, спиртівка або інше джерело відкритого полум'я, сконцентровані рослинні екстракти, суміші спирт - ДМСО (диметилсульфоксид) (1:1).

Хід роботи

1) Скринінгове дослідження рослинних екстрактів на протимікробну активність виконують методом дифузії в агар з використанням лунок відповідно до вказівок Державної Фармакопеї. Для дослідження використовують музейні культури штамів *B. subtilis*, *B. megaterium*, *S. flava* та *C. glutamicum*.

Приготування поживного агару для культивування мікроорганізмів. 35г промислового препарату поживного агару розчинити в 1л дистильованої води. Отриманий розчин розмішати і прокип'ятити до повного розплавлення агару. Після цього отриману суміш профільтрувати, розлити у посуд об'ємом 250 мл і стерилізувати автоклавуванням при 121 °С, протягом 25 хвилин.

Виготовлення лунок. У чашки Петрі залити по 20 мл агаризованого живильного середовища. Після його повного застигання спеціальною скляною трубкою сформувати лунки діаметром 6 мм. Після цього на живильне середовище у чашках Петрі засіяти газомом 100 мкл 24-годинної суспензії тест-культури мікроорганізмів, використовуючи скляний шпатель Драгальського. Засіяні чашки витримати протягом 15 хв при кімнатній температурі для дифузії рідини в агар.

У лунки агару на засіяні тест-культурою чашки Петрі внести по 20 мкл розчину рослинного екстракту в суміші спирт – ДМСО (диметилсульфоксид) (1:1). Контролем служать лунки із

сумішшю спирт - ДМСО (1:1). Після внесення зразків, чашки знову витримати при кімнатній температурі протягом 15 хв, після чого провести інкубацію у термостаті при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$ упродовж доби.

Визначення діаметра зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунок здійснити за допомогою біокуляра МБС-10 з окуляр-мікрометром з точністю до 0,1 мм.

Результати занести у таблицю, визначити ступінь чутливості мікроорганізмів до рослинних екстрактів за попередньо наведеними критеріями.

Рослинний екстракт	Діаметр зони затримки росту	Ступінь чутливості

Висновок _____

Контрольні завдання та запитання:

1. Назвіть основні методи скринінгового дослідження антимікробної активності рослинних екстрактів.

2. Назвіть основні прийоми проведення методу дифузії в агар.

3. Опишіть принцип методу розведень. Поясніть можливість його застосування при вивченні антимікробної активності.

4. Обґрунтуйте вибір штамів мікроорганізмів, що використовуються для визначення антимікробної активності.

5. Як інтерпретуються результати досліджень за показниками зон лізису бактеріальної культури ?

Тема. 6. Знешкодження відходів біотехнологічних виробництв

Біотехнолог зобов'язаний забезпечувати безвідходність біотехнологічних виробництв для підтримання нормальної екологічної ситуації. На жаль, немає інформації про кількість відходів усіх біовиробництв у світі, але, безсумнівно, вони приголомшливо великі. Підраховано, наприклад, що на 1 т лимонної кислоти утворюється 150-200 кг сухого міцелію та 7м³ фільтрату. Кількість твердих і рідких відходів світового виробництва антибіотиків (30 000 т на рік) значно більша. Так, з одного апарата об'ємом 50 м³ у виробництві пеніциліну може бути одержано близько 1 т міцелію (у перерахунку на суху масу).

Відходи біотехнологічних виробництв зазвичай розкладаються в природних умовах під дією різних факторів: **біологічних** – мінералізація за участю мікроорганізмів, **хімічних** – окиснення, **фізико-хімічних** – завдяки комплексному впливу, наприклад, променистої енергії та хімічних речовин).

До твердих відходів біотехнологічних виробництв відносять:

- мікробну масу, відокремлену від культурального фільтрату, що надходить на подальші стадії виділення цільового продукту;
- шлами (від нім. – бруд), наприклад, біомасу після екстракції з неї цільового продукту;
- залишки курячих ембріонів після культивування, наприклад, вірусу грипу;
- деякі тканинні культури ссавців;
- осади зі стічних вод.

Якість твердих відходів певною мірою диктує вибір методу їхнього знезараження. Так, патогенні мікроорганізми повинні бути знешкоджені повністю і найефективнішим способом для цього є спалювання. Якщо відходом є біомаса стрептоміцетів, то їх достатньо знезаразити нагріванням з подальшим вивезенням на ферми для використання як кормових добавок або органічного добрива.

Якщо за технологічною схемою тверді й рідкі відходи подаються у вигляді змішаного стоку, то спочатку їх грубо розділяють, а потім видаляють вологу з наступною передачею ущільненої біомаси клітин на знешкодження наведеними способами.

Аналогічно знешкоджують тверді відходи рослинного або тваринного походження: токсичні спалюють, нетоксичні утилізують.

Рідкі відходи біотехнологічних виробництв досить різноманітні за своїм складом. Це пояснюється неповним використанням біологічними агентами компонентів поживних середовищ, наявністю різних продуктів метаболізму, розчинників, використовуваних, наприклад, для екстракції цільових продуктів тощо. Наприклад, сульфитні луги, утворювані на підприємствах целюлозно-паперової промисловості в результаті гідролізу деревини і використовувані для вирощування кормових дріжджів, містять у середньому сульфонату лігніну – 50 – 60 % , цукрових сульфокислот – 7 – 8 %, різних цукрів – близько 18 %, діоксиду сірки – 10 %, солей кальцію – 8 %. Після значного видалення сульфіту й відповідної підготовки (розведення, внесення деяких поживних інгредієнтів) луг використовують для вирощування адаптованої маси дріжджів. Біомаса дріжджів є цільовим продуктом, а відходом – культуральна рідина.

Рідкі відходи біотехнологічних виробництв, очищають у спеціальних пристроях – аеротенках.

Аеротенки – величезні резервуари із залізобетону, в яких очищення відбувається за допомогою активного мулу, до складу якого входять бактерії і найпростіші.

Активованій намул є суспензією часток піску і глини з адсорбованими на їх поверхні органічними речовинами та мікроорганізмами, Суть дії активованого намулу на забруднену санітарними та технічними відходами воду полягає в адсорбції на поверхні часток намулу токсичних речовин та їх перетворення (переважно окисленням) мікроорганізмами в нетоксичні продукти, або в продукти кінцевого розпаду: CO_2 , H_2O , NH_3 , H_2S , SO^{4-} та інші з виділенням у водне та повітряне середовище.

Усі організми розвиваються в результаті споживання органічних речовин стічних вод і надлишку кисню, що надходить з повітрям. Бактерії утворюють конгломерати і синтезують

ферменти, необхідні для деградації органічних речовин. Мул з такими конгломератами осідає, відділяючись від очищеної води. Інфузорії, джгутикові, амеби, коловертки й найпростіші живляться завислими бактеріями (планктоном).

У сприятливому режимі *аеротенок* (рН 4-6,5; +30-+45°C; вміст кисню 5-8 мг/л; концентрація розчинних речовин - 5-10%) спостерігається природне культивування таких груп мікроорганізмів:

- метанотворюючі – *Methanobacterium omelanki*, *M. mazei*;
- деградаційні – *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acetobacter*;
- специфічні до окремих сполук, наприклад фенолів – *Trichosporon cutanium*.

Лабораторна робота №11 **Біотехнологічна очистка стічних вод**

Мета заняття: ознайомитися з фільтруючими властивостями активованого намулу; здійснити очистку забрудненої фенолом стічної води.

Матеріали, реактиви й устаткування: промислова стічна вода, активований намул, NaOH, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, діазореактив, скляні колби або бюретки, фотоелектроколориметр.

Хід роботи

1. Скляну колонку (бюретку) розміром 1,5x35 см заповнити збовтаною суспензією активованого намулу. Щоб активований намул не проходив через колонку, на її дно розмістити клаптик скловати. Активований намул промити водопровідною водою об'ємом 0,5 л.

2. Відібрати 5 мл промислової стічної води в окрему пробірку. Відібрати близько 100 мл води і пропустити її через колонку з активованим намулом з швидкістю близько 5 мл/хв. З води, що витікає із колонки, відібрати 5 мл в окрему пробірку.

3. Вміст фенолів у воді до і після пропускання через активований намул визначити за реакцією із діазореактивом. Для цього: по 5 мл досліджуваних розчинів відібрати в окремі пробірки і додати 1 мл 0,3 н. розчину NaOH. Потім додати 4 мл розчину бури (35 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ на 1 л 15%-ного

етилового спирту) і 0,5 мл diaзореактиву (0,25 г 5-нітро-2-аміноанізоли або п-нітроаніліну розчинених в 100 мл охолодженої води, відфільтрувати і додати 1 мл 5%-ну H_2SO_4). Через 3-6 хв. забарвлений розчин аналізують на фотоелектроколориметрі при синьо-зеленому світлофільтрі (360 нм.).

5. Для порівняння та кількісних розрахунків приготувати стандартний розчин фенолу з вмістом речовини 0,5-5 мкг. Розрахунки здійснити за формулою:

$$a = a_{ст} \times E_{досл}, \text{ де:}$$

a - вміст фенолу в дослідній пробі, мг/л

$a_{ст}$ - вміст фенолу в стандартній пробі, мкг/л

E і $E_{ст}$ - оптична густина дослідного і стандартного розчинів, відповідно.

6. На основі розрахунків зробити висновки про очисні властивості активованого намулу.

Висновок _____

Контрольні завдання та запитання:

1. Поясніть принципи та способи мікробної деградації та хімічної конверсії відходів.
2. Укажіть способи біологічної очистки стічних вод.
3. Охарактеризуйте будову та принцип дії аеротенка.
4. Як проводиться контроль процесу біологічного очищення води?
5. Назвіть основні відходи та побічні продукти, придатні до біотехнологічної переробки.

Тема. 7. Санітарно-гігієнічний контроль на біотехнологічних підприємствах

Контроль апаратів й устаткування проводять безпосередньо після мийки, дезінфекції й пропарювання перед початком роботи шляхом висіву відібраних змивів для визначення загальної кількості мікроорганізмів у 1 мл, а якщо буде потреба – присутності слизоутворюючих бактерій.

На ряді біотехнологічних підприємств (пивоварних, молочних, хлібопекарських, дріжджових) змиви одночасно досліджують на наявність бактерій групи кишкової палички.

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

Змиви з великого устаткування й апаратів беруть за допомогою нержавіючих металевих трафаретів з вирізаною серединою (площа вирізу 10, 25 або 100 см²).

Перед узяттям проби трафарет змочують спиртом, обпалюють і накладають на досліджувану поверхню. Обмежену площу промивають змоченим тампоном, після чого тампон опускають у ту ж пробірку, занурюють у воду, що залишилася, або фізіологічний розчин і добре перемішують. Висівають 1 мл змиву на МПА. Визначають загальну кількість мікроорганізмів після термостатування при 37°C на протязі 48 год. Змив можна використати для визначення слизеутворюючих бактерій (лейконостока) висівом на спеціальні середовища. Залишок змивної рідини разом з тампоном засівають у пробірки з поплавцями й 5 мл середовища Кесслер, витримують у термостаті при 43°C на протязі 18-24 год. Застосовуючи індикаторний папір, аналіз реєструють через 12 год при 43 °С. У змивах стерильного устаткування й апаратів мікроорганізми відсутні. У добре вимитих апаратах загальна кількість мікроорганізмів і титр кишкової палички не повинні перевищувати їх вмісту в чистій воді, яка надходить на мийку. Кількість слизеутворюючих бактерій не повинно бути більше 0-5 в 1 мл.

Внутрішня поверхня трубопроводів, рукавів, шлангів, деяких апаратів недоступна для взятті змивів за допомогою трафарету. У цьому випадку перевірку на наявність мікроорганізмів і колі-титр ведуть шляхом мікроскопіювання препаратів і посівом останньої промивної води. У стерильний посуд відбирають зразки води при виході з досліджуваних об'єктів. 10 мл промивної води центрифугують при 1500-2000 об/хв протягом 10 хв. Центрифугат зливають, осад мікроскопіюють. У 10 полях зору повинно бути не більше 5-6 клітин. Наявність мікроорганізмів у кожному полі зору вказує на незадовільну мийку. Посів на загальну кількість мікроорганізмів роблять на МПА або сусло-агар. Колі-титр визначають методом мембранних фільтрів або бродильних проб. Загальна кількість мікроорганізмів і колі-титр промивної води не повинні відрізнятися від показників води, яка використовується в виробництві.

Контроль посуду та інвентарю. Із кожної мийної машини відбирають 5-10 вимитих пляшок, які закривають стерильними ватяними пробками. У лабораторії їх ретельно ополіскують 100 мл стерильної води (або фізіологічного розчину), по черзі переливаючи з однієї пляшки в іншу й змочуючи всю її внутрішню поверхню. З останньої пляшки роблять висів для визначення загальної кількості мікроорганізмів, слизеутворюючих бактерій і колі-титру. Загальна кількість мікроорганізмів у перерахуванні на одну пляшку повинна бути не більше 300, в 1 кг промивної води - не більше ніж в воді яка застосовувалась для ополіскування пляшок; слизеутворюючі бактерії повинні бути відсутніми; колі-титр повинен бути не менш 100.

Для оцінки мийки цехового інвентарю проби відбирають у той момент, коли інвентар підготовлений до роботи. Із дрібного інвентарю (мішалки, пробники, термометри, ножі, шприци і т.п) мазки беруть стерильним тампоном з усією поверхні предмета й досліджують на загальну кількість визначення наявності кишкової палички.

Чистоту стін і підлоги виробничих приміщень контролюють шляхом мікроскопіювання проб, узятих у такий спосіб: зіскрібають частину забрудненої поверхні, зіскрібок поміщають

у пробірку зі стерильною водою, добре збовтують, готують препарат і переглядають під мікроскопом без фарбування або після фарбування мазків метиленовим синім. Для кількісного обліку мікроорганізмів користуються трафаретом і стерильним змоченим ватяним тампоном з наступним висівом на щільні середовища в чашки Петрі.

Чистоту рук перевіряють перед початком виробничого процесу у робітників, що мають безпосередній контакт із продукцією або чистим устаткуванням. Контроль роблять без попереднього попередження. Закріплений на дерев'яному стрижні стерильний тампон змочують стерильною водою (або фізіологічним розчином) і протирають їм долоні, тильну поверхню, під нігтями та між пальцями обох рук. Тампон занурюють у ту ж пробірку, в якій відбувалося змочування, добре збовтують, відбирають 1 мл і готують розведення (1:10 й 1: 100). Для визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл змиву роблять посів розведення на МПА з наступним термостатування при 37 °С протягом 48 год. Залишок змиву разом з тампоном висівають у пробірки із 5 мл середовища Кесслер і вирощують 24 год при температурі 43°С. Далі визначають наявність кишкових паличок методом бродильних проб.

Можна застосувати й такий метод: у складені разом кисті рук наливають 100 мл стерильної воли так, щоб вода добре промивала пальці. Стерильним тампоном протирають долоні й нігті. Воду збирають у стерильну склянку й туди ж кидають тампон. Змивну воду перемішують і роблять аналогічні посіви. Чистоту рук оцінюють за кількістю мікроорганізмів у 1 мл змиву при відсутності кишкових паличок:

Кількість мікроорганізмів у 1 мл змиву з рук	Оцінка чистоти
1000	Відмінно
1000-5000	Добре
5000-10000	Задовільно
Більше 10000	Погано

Періодично перевіряють обробку рук хлоруванням. Для цього проводять якісну реакцію: ватяний тампон змочують

йодкрохмальним розчином (суміш рівних кількостей 6%-ного розчину КІ й 4 %-ового розчину розчинного крохмалю) і протирають окремі ділянки рук. В присутності іонів хлору тампон і протираємий участок рук зафарбовуються в синьо-бурий колір.

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

Лабораторна робота № 12

Аналіз санітарного стану устаткування біотехнологічних виробництв

Мета роботи: Ознайомитися з методами санітарно-гігієнічного контролю на біотехнологічних підприємствах.

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

Хід роботи

Аналіз лабораторного обладнання, підлоги, стін й стерильного посуду.

1. Підготувати стерильні пробірки із рідким поживним бульйоном і скошеним поживним агаром, чашки Петрі із залитим і охолодженим поживним агаром. Підготувати та простерилізувати скляні палички з ватяним тампоном на кінці.

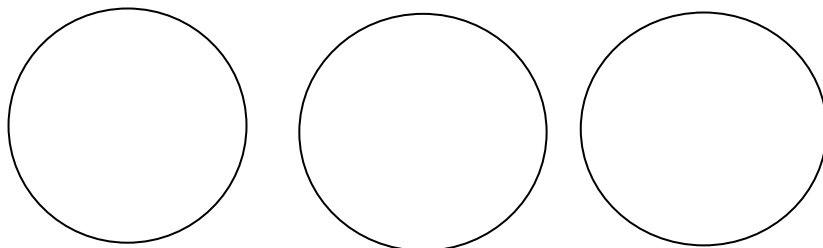
2. Змочити стерильний ватяний тампон у рідке живильне середовище чи стерильний фізіологічний розчин та провести посів спочатку у рідке поживне середовище, а далі, повторивши забір проби, на тверде середовище у чашках Петрі та пробірках. Закрити пробірки стерильними ватяними корками, чашки Петрі закрити кришками та перевернути їх догори дном для стікання конденсату. Помістити чашки Петрі та пробірки в умови термостату для культивування.

4. За аналогічним принципом провести посіви з поверхні рук.

5. Проаналізувати результати культивування через 1 та 3 доби.

Досліджуваний об'єкт	Кількість мікроорганізмів у 1 мл змиву

6. При отриманні позитивних результатів приготувати фіксовані препарати з кожної проби для аналізу морфологічних типів мікроорганізмів.



Висновок _____

Контрольні завдання та запитання:

1. Яким чином проводиться контроль апаратів та приладів на біотехнологічних підприємствах?
2. Яким чином проводиться контроль трубопроводів?
3. Яким чином проводиться контроль чистоти рук працівників? Укажіть параметри оцінки чистоти рук працівників.
4. Як проводиться забір проб з устаткування?

РОЗДІЛ II. ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ З КУРСУ «ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

Становлення та розвиток біотехнології

1. Укажіть перші біотехнологічні процеси, що застосовувалися людством протягом емпіричного періоду розвитку біотехнології:

- а) гасіння вапна,
- б) дублення шкіри,
- в) квашення овочів,
- г) вирощування злакових культур,
- д) отримання горілки із хлібних злаків.

2. На який період розвитку біотехнології припадає перше отримання абсолютного етанолу методом перегонки?

- а) етіологічний,
- б) геннотехнічний,
- в) емпіричний,
- г) біотехнічний.

3. З чім іменем пов'язаний розвиток етіологічного періоду в біотехнології?

- а) Л. Пастера,
- б) А.Коха,
- в) П.Ф. Уайта та Р.Готре,
- г) Ю.А. Овчиннікова.

4. Метод стерилізації, розроблений та впроваджений Л.Пастером, називається:

- а) флотація,
- б) пастеризація,
- в) контамінація,
- г) автоклавування.

5. Перші біоустановки були розроблені для:

- а) отримання дріжджових гідролізатів,
- б) отримання етанолу,
- в) мікробіологічного очищення стічних вод,
- г) мікробіологічного отримання біодобрив.

6. Засновником фізіологічної мікології вважають ученого:

- а) А. де Барі,
- б) Л. Пастера,
- в) І.І. Мечникова,
- г) Р.Готре.

7. Основними досягненнями біотехнічного періоду розвитку біотехнології були:

- а) відкриття антибіотиків.
- б) розробка біоустановок для очищення стічних вод,
- в) отримання абсолютного етанолу методом перегонки,
- г) впровадження ферментативного каталізу у промисловість.

10. Які відкриття стимулювали геннотехнічний період розвитку в біотехнології?

- а) встановлення структури ДНК (Ф. Крік та Дж. Утсон),
- б) відкриття мікробної природи бродіння (Л.Пастер),
- в) вивчення обміну речовин цвілевих грибів (Л.Х.Ц. Перкін),
- г) відкриття вірусів бактерій (Ф. Туорт, Ф. д'Ерель),
- д) відкриття плазмід (С. Коен).

11. Основоположником клітинної біотехнології вважають:

- а) Л. Пастера,
- б) А.Коха,
- в) П.Ф. Уайта та Р.Готре,
- г) Ю.А. Овчиннікова.

12. Основними досягненнями геннотехнічного періоду розвитку біотехнології є:

- а) розробка ферментерів,
- б) створення організмів на основі генно-інженерних технологій,
- в) отримання надпродуцентів,
- г) отримання антибіотиків,
- д) впровадження ферментативного каталізу.

13. Комплекс методів очищення води, ґрунтів і атмосфери з використанням метаболічного потенціалу живих організмів називається:

- а) біотрансформацією,

- б) біодеградацією,
- в) біоремедіацією,
- г) моніторингом.

14. Традиційна біотехнологія охоплює:

- а) генно-інженерні методи,
- б) методи культури *in vitro*,
- в) технічну мікробіологію,
- г) інженерну ензимологію,
- д) промислову біотехнологію.

15. Новітня біотехнологія охоплює:

- а) генно-інженерні методи,
- б) методи культури *in vitro*,
- в) технічну мікробіологію,
- г) інженерну ензимологію,
- д) промислову біотехнологію.

16. Автотрофні та хемотрофні організми, які синтезують органічні речовини з мінеральних за використання сонячної енергії або енергії, що виділяється під час хімічних реакцій, називаються:

- а) консументи,
- б) редуценти,
- в) продуценти,
- г) деструктори.

Основні складові біотехнологічного процесу

1. Основними біологічними агентами, що застосовується в біотехнології, є:

- а) рослини,
- б) тварини,
- в) мікроорганізми,
- г) лишайники та гриби,
- д) віруси.

2. Суперпродуцентами чи надпродуцентами називаються організми, які:

- а) синтезують первинні метаболіти у кількостях, необхідних для потреб власного організму,
- б) синтезують вторинні метаболіти у кількостях, необхідних

для потреб власного організму,

в) синтезують будь-який цільовий продукт у кількостях, що переважають потреби організмів,

г) синтезують вторинні метаболіти у кількостях, що переважають власні потреби,

д) синтезують первинні метаболіти у кількостях, що переважають власні потреби.

3. Основними характеристиками мікроорганізмів як біологічних агентів є:

а) здатність до біотрансформації,

б) здатність до надсинтезу,

в) низька швидкість росту,

г) висока лабільність до умов навколишнього середовища,

д) складна «організація» геному,

е) нездатність рости на простих субстратах.

4. Із наведеного переліку оберіть біологічні агенти, що є об'єктами біотехнології:

а) клітини мікроорганізмів (бактерії, у тому числі актиноміцети, гриби, у тому числі дріжджі, найпростіші),

б) клітини тварин, рослин, у тому числі одержані методами генної та клітинної інженерії;

в) віруси, у тому числі бактеріофаги;

г) компоненти клітин: протопласти, мембрани, мітохондрії, хлоропласти, внутрішньоклітинні ферменти та ін;

д) позаклітинні продукти (ферменти);

е) іммобілізовані клітини мікроорганізмів, тварин, рослин, їх компоненти та позаклітинні продукти,

є) усі перераховані.

5. Фаза клітинного циклу еукаріот, в якій відбувається поділ материнської клітини на дві дочірні, називається:

а) мітоз М-фаза,

б) G_1 – фаза ,

в) S – фаза,

г) G_2 – фаза.

6. Фаза клітинного циклу еукаріот, яка охоплює проміжок часу від кінця М-фази до початку синтезу ДНК, називається:

- а) мітоз М-фаза,
- б) G_1 – фаза ,
- в) S – фаза,
- г) G_2 – фаза.

7. Фаза клітинного циклу, в якій відбувається синтез ДНК, називається:

- а) мітоз М-фаза,
- б) G_1 – фаза ,
- в) S – фаза,
- г) G_2 – фаза.

8. Проміжок часу від кінця S-фази до початку М-фази називається:

- а) мітоз М-фаза,
- б) G_1 – фаза ,
- в) S – фаза,
- г) G_2 – фаза.

9. Інтерфазою називається сукупність фаз:

- а) G_1 , S та G_2 ,
- б) S та М,
- в) G_1 та G_2 ,
- г) G_1 , S, М та G_2 .

10. Тривалість клітинного циклу мікробних клітин становить:

- а) 0,5 – 2 год,
- б) 2 -10 год,
- в) 2 – 3 дні,
- г) декілька років.

11. Фаза кривої росту, що починається з моменту посіву культури на свіже живильне середовище, називається:

- а) лаг-фаза,
- б) експоненційна фаза,
- в) стаціонарна фаза,
- г) фаза сповільненого росту,
- д) фаза відмирання,
- е) фаза виживання.

12. Тривалість лаг-фази залежить від:

- а) віку інокуляту,
- б) умов культивування,

- г) складу живильного середовища,
- д) не залежить від жодного з указаних факторів,
- е) залежить від усіх факторів.

13. Максимальною швидкістю поділу клітин культури характеризується:

- а) лаг-фаза,
- б) експоненційна фаза,
- в) стаціонарна фаза,
- г) фаза сповільненого росту.

14. У якій фазі росту культури подвоєння біомаси супроводжується подвоєнням кількості білка?

- а) лаг-фаза,
- б) експоненційна фаза,
- в) стаціонарна фаза,
- г) фаза сповільненого росту.

15. У якій фазі росту спостерігається рівновага між клітинами, що діляться та клітинами, що гинуть?

- а) лаг-фаза,
- б) експоненційна фаза,
- в) стаціонарна фаза,
- г) фаза сповільненого росту.

16. Фаза сповільненого росту зумовлена:

- а) виснаженням живильного середовища,
- б) дефіцитом кисню,
- в) накопиченням продуктів метаболізму,
- г) змінами рН,
- д) усіма вказаними факторами.

17. Автоліз – це:

- а) лізис клітин під дією власних ферментів,
- б) лізис клітин під дією антибіотиків,
- в) біотрансформація власної органічної речовини.

18. Тривалість кожної з фаз росту еукаріот залежить від:

- а) виду мікроорганізмів,
- б) умов культивування,
- в) бажання дослідника,
- г) тривалість завжди постійна.

19. Яка із фаз клітинного росту мікроорганізмів характеризується максимальною кількістю синтезованих

вторинних метаболітів?

- а) лаг-фаза,
- б) експоненційна фаза,
- в) фаза сповільненого росту,
- г) стаціонарна фаза.

20. Яка із фаз клітинного росту мікроорганізмів характеризується максимальним приростом біомаси?

- А) лаг-фаза,
- Б) експоненційна фаза,
- В) фаза сповільненого росту,
- Г) стаціонарна фаза.

21. Культури, в яких певний час усі клітини діляться одночасно за рахунок однакової готовності до росту та поділу окремих особин, називаються:

- а) хемостатні,
- б) синхронні,
- в) безперервні,
- г) турбідостатні.

22. Які із наведених вимог до промислових штамів мікроорганізмів не є визначальними?

- а) здатність рости на дешевих і доступних субстратах;
- б) здатність синтезувати максимум цільового продукту за мінімального утворення побічних;
- в) генетична й фізіологічна стабільність,
- г) стійкість до фагів і сторонньої мікрофлори,
- д) термофільність, ацидофільність.

23. Укажіть, які штами мікроорганізмів використовуються в промисловості?

- а) природні штами, вдосконалені селекційними методами,
- б) штами, змінені в результаті індукованих мутацій,
- в) генетично модифіковані штами,
- д) усі наведені.

24. Протягом якого терміну можна зберігати штами-продуценти на скошеному агарі, при температурі 0 - -4°С?

- а) 3-4 місяці,
- б) 6-12 місяці,
- в) 3-5 років

г) 5-6 років.

25. Протягом якого терміну можна зберігати штамп-продуценти на зерні або у ґрунті?

- а) 3-4 місяці,
- б) 6-12 місяці,
- в) 3-5 років
- г) 5-6 років.

26. Протягом якого терміну можна зберігати штамп-продуценти у ліофілізованому стані?

- а) 3-4 місяці,
- б) 6-12 місяці,
- в) 3-5 років
- г) 5-6 років.

27. Протягом якого терміну можна зберігати штамп-продуценти у шарі вазелінової олії?

- а) 3-4 місяці,
- б) 6-12 місяці,
- в) 3-5 років
- г) 5-6 років.

28. Метод а-висушування – це:

- а) висушування культури в атмосфері азоту,
- б) висушування культури під вакуумом безпосередньо з рідкого середовища,
- в) висушування культури на піщаній бані.

29. Збереження продукуючої здатності штамів поліпшується:

- а) коли консервація проводиться за низької активності культури,
- б) за наявності захисних середовищ,
- в) при підвищених температурах,
- г) на насичених живильних середовищах.

30. Які речовини використовують як кріопротектори у складі живильних середовищ для зберігання культур в атмосфері азоту?

- а) гліцерин,
- б) сахароза,
- в) гліцин,
- г) триацилгліцероли.

Методи біотехнології.
Культивування клітин. Біореактори

1. Процес вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах - це:

- а) автоклавування,
- б) культивування,
- в) сепарування,
- г) дезінтеграція.

2. Перше повне середовище було розроблене для культивування культур:

- а) *Aspergillus*,
- б) *Bacillus*,
- в) *Anabaena*.

3. Культура, що містить тільки один вид мікроорганізмів, називається:

- а) чиста культура,
- б) тимчасова культура,
- в) постійна культура.

4. Культура еталонного тесту-штаму в умовах тимчасового зберігання на відповідному середовищі називається:

- а) культура тривалого зберігання,
- б) культура тимчасового зберігання,
- в) культура цільового використання.

5. За станом живильного середовища культури поділяються на:

- а) поверхневі та глибинні,
- б) динамічні та статичні,
- в) аеробні та анаеробні,
- г) періодичні й безперервні,
- д) хемостатні та турбідостатні.

6. За вмістом у системі культивуванні кисню культури поділяються на:

- а) поверхневі та глибинні,
- б) динамічні та статичні,
- в) аеробні та анаеробні,
- г) періодичні й безперервні,

д) хемостатні та турбідостатні.

7. За способом управління культури поділяються на:

- а) поверхневі та глибинні,
- б) динамічні та статичні,
- в) аеробні та анаеробні,
- г) періодичні й безперервні,
- д) хемостатні та турбідостатні.

8. Система, в яку всі компоненти можуть надходити або залишати її, називається:

- а) замкнута система,
- б) відкрита система.

9. Система, у якій хоча б оди з існуючих компонентів не може надходити або залишати її, називається:

- а) замкнута,
- б) відкрита.

10. Укажіть переваги масової культури на твердому середовищі:

- а) легко знімається біомаса з поверхні середовища,
- б) культура повністю вільна від залишків живильного середовища,
- в) обмеження при вирощуванні великої кількості біомаси,
- г) неоднорідність популяції клітин,
- д) можливість роботи з міцелієм,
- е) невелика кількість клітин у перерахунку на об'єм середовища.

11. Укажіть недоліки масової культури на твердому середовищі:

- а) легко знімається біомаса з поверхні середовища,
- б) культура повністю вільна від залишків живильного середовища,
- в) обмеження при вирощуванні великої кількості біомаси,
- г) неоднорідність популяції клітин,
- д) можливість роботи з міцелієм,
- е) невелика кількість клітин у перерахунку на об'єм середовища.

12. Суспензійна культура – це:

- а) вирощування тканин на живильних середовищах,
- б) культура мікроорганізмів, що містить тільки один вид

мікроорганізмів,

в) вирощування окремих клітин або невеликих груп клітин у завислому стані в рідкому середовищі за постійної аерації та перемішування,

г) вирощування окремих клітин або невеликих груп клітин у завислому стані в рідкому середовищі без перемішування та аерації.

13. Періодичний тип культивування передбачає:

а) одночасне внесення всіх складових (живильного середовища, інокуляту, тощо...) на початку процесу та культивування до досягнення заданої фази,

б) поступове внесення всіх складових протягом усього терміну культивування,

в) поступове відділення культуральної рідини протягом усього терміну культивування.

14. Багатофазна система, що містить клітини продуцента, залишки компонентів живлення та продукти метаболізму, називається:

А) живильне середовище,

Б) культуральна рідина,

В) флутат,

Г) екстрагент.

15. Концентрація мікроорганізмів у періодичній культурі лімітується:

а) виснаженням субстрату,

б) накопиченням продуктів життєдіяльності,

в) бажанням дослідника,

г) не лімітується.

16. Практично всі системи періодичного культивування:

а) відкриті,

б) закриті.

17. Чи має значення концентрація інокуляту для тривалості періодичної культури?

а) зі збільшенням концентрації інокуляту тривалість культивування зменшується,

б) зі збільшенням концентрації інокуляту тривалість культивування збільшується,

в) тривалість культивування не залежить від концентрації

інокуляту.

18. Продовжене періодичне культивування застосовують, коли:

- а) живильне середовище пригнічує ріст мікроорганізмів,
- б) цільовий продукт є токсичним для культури,
- в) недостатній об'єм ферментера,
- г) недостатня концентрація інокулюму.

19. Діалізні культури застосовують у випадку, коли:

- а) живильне середовище пригнічує ріст мікроорганізмів,
- б) цільовий продукт є токсичним для культури,
- в) недостатній об'єм ферментера,
- г) недостатня концентрація інокулюму.

20. При безперервному культивуванні середовище подається:

- а) усе й одночасно,
- б) поступово, протягом усього терміну культивування,
- в) частинами, до досягнення певної концентрації.

21. Якщо при безперервному культивуванні щільність популяції визначається хімічним складом середовища, то такий тип називається:

- а) хемостатне культивування,
- б) синхронне культивування,
- в) турбідостатне культивування.

22. Якщо швидкість подачі середовища залежить від зареєстрованої щільності культури, то такий тип називається:

- а) хемостатне культивування,
- б) синхронне культивування,
- в) турбідостатне культивування.

23. Багатофазні системи, в яких культура росте на межі двох фаз, називаються:

- а) синхронні культури,
- б) діалізні культури,
- в) твердорідинні культури,
- г) турбідостатні культури.

24. У багатофазних системах ріст культури лімітується:

- а) дифузією субстрату і кисню у плівку клітин,
- б) збільшенням концентрації метаболітів,

- в) збільшенням кількості біомаси,
- г) доступністю CO₂.

25. Культивування мікроорганізмів, які утворюють плівку з біомаси здійснюють у біореакторах типу:

- а) проточні колонки з наповнювачем,
- б) колонки з рухомими носіями,
- в) біореактори киплячого шару,
- г) біореактори мембранного типу.

26. Біореактори з рухомими мікроносіями для поверхнево залежних культур тканин використовують для культивування:

- а) генетично модифікованих мікроорганізмів,
- б) іммобілізованих біологічних агентів,
- в) бактерійних культур,
- г) очищення стічних вод,
- д) клітин рослин і тварин.

27. Біореактори киплячого шару використовують для:

- а) генетично модифікованих мікроорганізмів, клітин рослин і тварин,
- б) іммобілізованих біологічних агентів,
- в) бактерійних культур,
- г) очищення стічних вод,
- д) клітин рослин і тварин.

28. Біореактори типу проточних колонок використовують для культивування:

- а) генетично модифікованих мікроорганізмів, клітин рослин і тварин,
- б) іммобілізованих біологічних агентів,
- в) бактерійних культур,
- г) очищення стічних вод,
- д) клітин рослин і тварин.

29. Біореактори мембранного типу використовують для культивування:

- а) генетично модифікованих мікроорганізмів, клітин рослин і тварин,
- б) іммобілізованих біологічних агентів,
- в) бактерійних культур,
- г) очищення стічних вод,

д) клітин рослин і тварин.

30. Культура, при якій мікробна популяція штучно вводиться в однорідний фізіологічний стан, називається:

- а) діалізною,
- б) синхронною,
- в) поверхневою,
- г) хемостатною.

31. Для синхронного поділу клітин зазвичай застосовують культуру у:

- а) стаціонарній фазі росту,
- б) експоненційній фазі росту,
- в) лаг-фазі,
- г) фазі виживання,
- д) фазі сповільненого росту.

32. Індекс синхронізації – це індекс, що характеризує:

- а) ступінь однорідності популяції, після впливу факторів синхронізації,
- б) ступінь неоднорідності популяції до початку впливу факторів синхронізації,
- в) ступінь неоднорідності популяції після впливу факторів синхронізації.

33. Індекс синхронізації Шербаума (I_s) визначається за формулою:

- а) $I_s = (N_1/N_0 - 1) \times (1 - T/g)$,
- б) $I_s = (N_1/N_0 - 1)$,
- в) $I_s = (N_1/N_0) \times (T/g)$.

Етапи біотехнологічного процесу.

Передферментаційний процес

1. Які із наведених нижче етапів охоплює передферментаційний процес:

- а) підготовку апаратури, поживних середовищ, повітря,
- б) виробничий біосинтез,
- в) підготовку посівного матеріалу,
- г) отримання цільового продукту,

д) очищення відходів виробництва.

2. Які із наведених нижче етапів не належить до передферментаційного процесу:

- а) підготовка апаратури, поживних середовищ, повітря,
- б) виробничий біосинтез,
- в) підготовка посівного матеріалу,
- г) отримання цільового продукту,
- д) очищення відходів виробництва.

3. Субстанція, що використовується для лабораторного вирощування культур, називається:

- а) живильне середовище,
- б) культуральна рідина,
- в) клітинна маса.

4. Вставте пропущений термін:

а) сировина, що являє собою індивідуальні сполуки з точним хімічним складом, називається _____,

б) складна суміш органічних речовин, де відомо вміст «головного» компонента, який впливає на ріст мікроорганізмів, називається _____.

5. Укажіть переваги комплексних середовищ:

- а) наявність ростових факторів,
- б) відсутність ростових факторів,
- в) наявність контамінантної мікрофлори,
- г) складна хімічна структура,
- д) велика кількість вільної вологи,
- е) низька ціна.

6. Із наведеного переліку виберіть основні недоліки комплексної сировини:

- а) наявність ростових факторів,
- б) відсутність ростових факторів,
- в) наявність контамінантної мікрофлори,
- г) складна хімічна структура,
- д) велика кількість вільної вологи,
- е) низька ціна.

7. Із наведеного переліку виберіть основні види синтетичної сировини, що використовуються у біотехнології:

- а) глюкоза, сахароза,
- б) етанол,

- в) рослинні олії та тваринні жири, г) екстракт дріжджів,
д) крохмаль, е) целюлоза, е) гідрол.

8. Основний субстрат для мікробіологічного синтезу - :

- а) азотвмісна сировина,
б) вуглецевмісна сировина,
в) кисневмісна сировина,
г) фосфорвмісна сировина.

9. Із наведеного переліку виберіть основні види комплексної сировини, що використовуються у біотехнології:

- а) глюкоза, сахароза, б) етанол,
в) рослинні олії та тваринні жири, г) екстракт дріжджів,
д) крохмаль, е) целюлоза, е) гідрол.

10. Гідрол є відходом виробництва при:

- а) пивоварінні,
б) отриманні кормових дріжджів,
в) отриманні етанолу,
г) отриманні глюкози з крохмалю.

11. Пшеничні висівки як комплексне середовище в біотехнології характеризується:

- а) високим вмістом крохмалю (16-20 %),
б) низьким вмістом крохмалю (0,1-1 %),
в) високим вмістом білку (10-12 %),
г) низьким вмістом білку (0,5-5 %),
д) високим вмістом зольних елементів.

12. Пивна дробина – це відходи пивоваріння, що містять:

- а) близь 20 % сухої маси застосованої сировини,
б) близько 10 % біомаси дріжджів,
в) близько 0,5 % безазотистих екстрактивних речовин,
г) тільки близько 5 % целюлози.

13. Виберіть спосіб нейтралізації поживних середовищ, що містять крохмаль:

- а) заморожування до -70 °С,
б) використання амілолітичних ферментів,
в) кип'ятіння з крейдою,
г) кип'ятіння з ПАР
д) емульгування.

14. Виберіть спосіб нейтралізації поживних середовищ,

що містять малорозчинні інгредієнти:

- а) заморожування до -70°C ,
- б) використання амілолітичних ферментів,
- в) кип'ятіння з крейдою,
- г) кип'ятіння з ПАР
- д) емульгування.

15. Виберіть спосіб нейтралізації поживних середовищ, що містять кукурудзяний екстракт:

- а) заморожування до -70°C ,
- б) використання амілолітичних ферментів,
- в) кип'ятіння з крейдою,
- г) кип'ятіння з ПАР,
- д) емульгування.

16. Процес звільнення будь-якого матеріалу від живих мікроорганізмів або їх форм спокою називається:

- а) контамінація,
- б) стерилізація,
- в) адаптація,
- г) репарація.

17. Повторне забруднення інокульованого середовища називається:

- а) контамінація,
- б) стерилізація,
- в) адаптація,
- г) репарація

18. Для стерилізації інструментів найбільш придатний метод стерилізації - це:

- а) стерилізація сухим паром,
- б) стерилізація сухим жаром,
- в) стерилізація у полум'ї,
- г) стерилізація з використанням мембранних фільтрів.

19. Посуд, масла та тверді компоненти поживних середовищ стерилізують:

- а) сухим жаром,
- б) вологим жаром,
- в) фільтрацією,
- г) хімічними речовинами.

20. Термолабільні компоненти поживних середовищ

стерилізують:

- а) сухим жаром,
- б) вологим жаром,
- в) фільтрацією,
- г) хімічними речовинами.

21. Для стерилізації рідких чи агаризованих поживних середовищ застосовують метод:

- а) стерилізація сухим паром,
- б) стерилізація сухим жаром,
- в) стерилізація у полум'ї,
- г) стерилізація з використанням мембранних фільтрів.

22. Для стерилізації біореакторів та апаратури застосовують метод:

- а) стерилізація у полум'ї,
- б) стерилізація гострою парою,
- в) хімічна стерилізація,
- г) стерилізація сухим жаром.

23. Основним стерилізуючим реагентом при хімічній стерилізації поживних середовищ є:

- а) β -пропіолактон,
- б) диетилпірокарбонат,
- в) сесквілактон,
- г) етиленпропіолактон.

24. Спори більшості дріжджів та грибів при автоклавуванні гинуть через:

- а) 5-10 хв при температурі 60 °С,
- б) 25-30 хв при температурі 80 °С,
- в) 25-30 хв при температурі 120 °С,
- г) 30-60 хв при температурі 180 °С.

25. Спори більшості бактерій при автоклавуванні гинуть через:

- а) 5-10 хв при температурі 60 °С,
- б) 25-30 хв при температурі 80 °С,
- в) 25-30 хв при температурі 120 °С,
- г) 30-60 хв при температурі 180 °С.

26. Вегетативні клітини більшості бактерій і грибів при автоклавуванні гинуть через:

- а) 5-10 хв при температурі 60 °С,

- б) 25-30 хв при температурі 80 °С,
- в) 25-30 хв при температурі 120 °С,
- г) 30-60 хв при температурі 180 °С.

27. Максимальним вмістом мікроорганізмів характеризується повітря на рівні:

- а) 20-30 м над землею,
- б) 40-50 м над землею,
- в) 2-10 м над землею,
- г) 0-2 м над землею.

28. Найефективнішим способом очищення відпрацьованого повітря є:

- а) спалювання,
- б) опромінення,
- в) відфільтровування,
- г) хімічна обробка.

29. Частина посівного матеріалу, яка вноситься в біореактор для ферментації, називається:

- а) експлант,
- б) посівний матеріал,
- в) інокулят,
- г) музейна культура.

30. Для продуцентів з ослабленою вегетацією та актиноміцетів доза посівного матеріалу в основному складає:

- а) 0,2-1 %,
- б) 1 – 2,5 %,
- в) 5 – 6 %,
- г) 15 – 20 %.

31. Для спорової культури доза посівного матеріалу в основному складає:

- а) 0,2-1 %,
- б) 1 – 2,5 %,
- в) 5 – 6 %,
- г) 15 – 20 %.

32. Для мікроскопічних грибів доза посівного матеріалу в основному складає:

- а) 0,2-1 %,
- б) 1 – 2,5 %,

- в) 5 – 6 %,
- г) 15 – 20 %.

33. Укажіть термін зберігання готового посівного матеріалу для поверхневого культивування:

- а) 2-3 доби,
- б) 1-2 доби,
- в) 12-24 години,
- г) 2-3 години.

34. Укажіть термін зберігання готового посівного матеріалу для глибинного культивування:

- а) 2-3 доби,
- б) 1-2 доби,
- в) 12-24 години,
- г) 2-3 години.

35. Найефективнішим методом стерилізації є:

- а) стерилізація сухим жаром,
- б) стерилізація вологим жаром,
- в) фільтрація,
- г) хімічна стерилізація.

36. На якій висоті потрібно проводити забір повітря для біотехнологічного процесу?

- а) 20-30 м над землею,
- б) 40-50 м над землею,
- в) 2-10 м над землею,
- г) 0-2 м над землею.

37. Найефективніший спосіб очищення забраного повітря:

- а) спалювання,
- б) опромінення,
- в) відфільтровування,
- г) хімічна обробка.

38. Основний забруднювач відпрацьованого повітря -:

- а) культуральна рідина,
- б) пил,
- в) смоли,
- г) аміни та альдегіди.

39. Чиста культура штаму-продуцента, отримана шляхом послідовного пересівання із пробірки в колбу,

називається:

- А) експлант,
- Б) посівний матеріал,
- В) інокулят,
- Г) музейна культура.

Ферментаційний процес.
Виробничий біосинтез

1. Вставте пропущений термін:

а) ферментативний процес, у результаті якого певні метаболіти утворюються безпосередньо під час культивування мікроорганізмів-продуцентів, називається_____.

б) ферментативний процес, який здійснюють виділені із природних об'єктів (частіше мікроорганізмів) ферменти або клітини мікроорганізмів з необхідними ферментними системами, називається_____.

2. Укажіть продукти мікробного синтезу, які займають провідне місце за обсягами виробництва_____.

3. Процес внесення продуцента на живильне середовище у біореактор - це:

- а) флокуляція,
- б) інокуляція,
- в) пасажування,
- г) флотажія

4. Який об'єм ферментера заповнюють інокульованим середовищем?

- а) 20-30 %,
- б) 50-60 %,
- в) 70-80 %,
- г) 100 %.

5. Який об'єм ферментера заповнюють інертними газами?

- а) 20-30 %,
- б) 50-60 %,
- в) 70-80 %,
- г) 100 %.

6. Яка тривалість ферментації для більшості схем біотехнологічного процесу?

- а) 10-30 діб,
- б) 5-14 діб,
- в) 1-3 доби,
- г) 30-45 діб.

7. На винекнення яких процесів буде впливати аерація поживного середовища?

- а) піноутворення,
- б) агрегацію,
- в) адсорбцію,
- г) флотацію.

8. Із наведеного переліку хімічних речовин виберіть ті, що належать до синтетичних піногасників:

- а) силікони, пропіноли, контрамін,
- б) ненасичені жирні кислоти,
- в) поліфеноли, нафтоли,
- г) солі органічних кислот.

9. Рівень спінювання живильних середовищ залежить від:

- а) складу живильного середовища,
- б) інтенсивності перемішування,
- в) виду мікроорганізма-продуцента,
- г) тривалості ферментації.

10. Із наведених рослинних олій виберіть ті, використання яких як піногасників економічно доцільне:

- а) кукурудзяна,
- б) соняшникова,
- в) рапсова
- г) оливкова.

11. Для того, щоб триацилгліцероли проявляли функцію піногасників, їх концентрація у живильному середовищі повинна становити:

- а) 0,2 – 1 %,
- б) 2,-5 %,
- в) менше 0,5 %,
- г) більше 5%.

12. Процес утворення мікробних конгломератів під час

культивування називається:

- а) адсорбція,
- б) флотація,
- в) флокуляція,
- г) іммобілізація.

13. Розподіліть указані флокулянти на дві групи:

- 1. неорганічні флокулянти _____,
 - 2. органічні флокулянти _____.
- а) хлорид кальцію,
 - б) солі фосфорної кислоти,
 - в) акриламід,
 - г) натрієві солі акрилової кислоти,
 - д) цетазолакриламід.

14. З якою метою у середовище культивування вносять

ПАР?

- а) як флокулянти,
- б) як піногасники,
- в) як адсорбенти,
- г) як живильні компоненти.

15. Метод стабілізації недостатньо стійких речовин шляхом обмеження їх рухливості називається:

- а) адсорбція,
- б) флотація,
- в) флокуляція,
- г) іммобілізація.

16. Для іммобілізації культур мікроорганізмів використовують клітини у:

- а) експоненційній фазі,
- б) стаціонарній фазі,
- в) лаг-фазі,
- г) фазі відмирання.

17. Як впливають клітини, що ростуть, на структуру носія при іммобілізації?

- а) порушують структуру носія,
- б) не впливають на структуру носія,
- в) вивільняються з структури носія.

18. Із наведеного переліку виберіть вимоги до промислових штамів продуцентів:

- а) оптимальна швидкість росту,
- б) стабільність фізіологічних показників,
- в) максимальна асиміляція поживних речовин,
- г) мінімальний синтез побічних продуктів,
- д) висока швидкість синтезу цільового продукту,
- е) усе наведене вище.

19. Регуляція технологічних процесів мікробного синтезу полягає у:

- а) регуляції характерних біохімічних реакцій,
- б) регуляції кількості живильних середовищ,
- в) регуляції кількості біомаси.

20. Які фактори будуть впливати на перебіг біохімічних реакцій при культивуванні?

- а) внесення у середовище попередників синтезу цільових продуктів,
- б) внесення інгібіторів,
- в) внесення індукторів та репресорів синтезу,
- г) усі наведені фактори.

21. Фаза промислового культивування продуцентів, у період якої спостерігається швидкий ріст біомаси та споживання субстрату, називається:

- а) лаг-фаза,
- б) трофофаза,
- в) ідіофаза,
- г) стаціонарна фаза,
- д) фаза експоненційного росту.

22. Фаза промислового культивування продуцентів, яка характеризується сповільненим ростом культури та накопичення продуктів метаболізму, називається:

- а) лаг-фаза,
- б) трофофаза,
- в) ідіофаза,
- г) стаціонарна фаза,
- д) фаза експоненційного росту.

23. Культуральна рідина промислового штаму у період трофофази характеризується:

- а) підвищеним вмістом азоту, вуглецю та фосфору неорганічного,

- б) підвищеним вмістом продуктів метаболізму,
- в) підвищеним вмістом органічних сполук,
- г) однаковою кількістю як органічних так і неорганічних сполук.

24. Із якої фази клітинного росту починається ідіофаза?

- а) лаг-фаза,
- б) експоненційна фаза
- в) стаціонарна фаза,
- д) фаза сповільненого росту,
- г) фаза відмирання.

25. Від чого залежить рівень рН культуральної рідини при культивуванні продуцентів?

- а) мінерального складу живильного середовища,
- б) кількості біомаси продуцента,
- в) тривалості культивування.

26. рН живильного середовища повинно знаходитись у межах:

- а) 4,5 – 5,4,
- б) 5,6 – 5,8,
- в) 4,3 – 4,9,
- г) 6,5 – 6,8.

27. З метою корекції рівня рН у середовище культивування вносять:

- а) розчини лугів,
- б) розчини кислот,
- в) додаткову кількість біомаси продуцента,
- г) додаткову кількість живильного середовища.

28. Які сполуки найчастіше додають у живильне середовище для забезпечення вуглеводного живлення культур?

- а) целюлозу, крохмал,
- б) сахарозу, глюкозу,
- в) ацетат, цитрат,
- г) хітин.

29. Який компонент живильного середовища відіграє роль осморегулятора?

- а) хелатна форма заліза,
- б) сахароза,

- в) агар-агар,
- г) ауксин.

30. Для уникнення фенольної інтоксикації у живильне середовище додають:

- а) антиоксиданти (цистеїн, аскорбінову кислоту, тощо..),
- б) водорозчинні вітаміни,
- в) активоване вугілля,
- г) вуглеводи.

31. Яку роль при культивуванні продуцентів відіграє склад і концентрація живильних середовищ?

- а) забезпечує процеси енергетичного та конструктивного метаболізму,
- б) сповільнює біохімічні реакції,
- в) визначає ступінь доступності води,
- г) визначає дифузію живильних речовин.

32. Яку роль при культивуванні продуцентів відіграє осмотичний тиск?

- а) забезпечує процеси енергетичного та конструктивного метаболізму,
- б) сповільнює біохімічні реакції,
- в) визначає ступінь доступності води,
- г) визначає дифузію живильних речовин.

33. Яку роль при культивуванні продуцентів відіграє в'язкість живильного середовища?

- а) забезпечує процеси енергетичного та конструктивного метаболізму,
- б) сповільнює біохімічні реакції,
- в) визначає ступінь доступності води,
- г) визначає дифузію живильних речовин.

34. Яку роль при культивуванні продуцентів відіграє концентрація продукту й інгібіторів?

- а) забезпечує процеси енергетичного та конструктивного метаболізму,
- б) сповільнює біохімічні реакції,
- в) визначає ступінь доступності води,
- г) визначає дифузію живильних речовин.

35. Оберіть методи керування для регуляції в'язкості середовища:

- а) використання середовища з оптимальною концентрацією,
- б) регуляція аерації,
- в) регуляція інтенсивності перемішування,
- г) осадження продуктів метаболізму по мірі накопичення,
- д) ферментація з діалізом.

36. Оберіть методи керування для регуляції концентрації продуктів й інгібіторів:

- а) використання середовища з оптимальною концентрацією,
- б) регуляція аерації,
- в) регуляція інтенсивності перемішування,
- г) осадження продуктів метаболізму по мірі накопичення,
- д) ферментація з діалізом.

37. Укажіть температурний оптимум для культивування мікроорганізмів-продуцентів:

- а) 20 – 40 °С,
- б) 0 – 20 °С,
- в) 40 – 70 °С,
- г) температура немає значення.

38. Явище послідовного використання двох субстратів, або явище двофазного росту мікробних культур називається:

- а) біотрансформація,
- б) діауксія,
- в) синхронізація,
- г) флотація.

39. В основі явища діауксії лежить:

- а) індукція субстратом,
- б) ретроінгібування,
- в) катаболічна репресія,
- г) репресія кінцевим продуктом.

Постферментативний процес.

Знешкодження відходів біотехнологічних виробництв

1. Вставте пропущений термін:

- а) кінцевим продуктом мікробіологічного синтезу може бути _____,
- б) вихідним матеріалом для виділення продуктів

мікробіологічного синтезу служить _____,

в) першою стадією підготовки культуральної рідини для подальшої переробки є _____,

в) рідка частина культуральної рідини називається _____.

2. При синтезі яких цільових продуктів утворюється високов'язка культуральна рідина?

а) екзополісахариди,

б) антибіотики,

в) органічні кислоти,

г) білки, ферменти.

3. Який метод відділення біомаси використовують при отриманні хлібопекарських і кормових дріжджів, продуктів із зелених водоростей?

а) центрифугування,

б) сепарування,

в) фільтрування,

г) флотація.

4. Який метод відділення біомаси використовують при виробництві білка з деяких одноклітинних мікроорганізмів та пивоварінні?

а) центрифугування,

б) сепарування,

в) фільтрування,

г) флотація.

5. Яка операція є необхідною, коли цільові продукти містяться в біомасі?

а) флотація,

б) дезінтеграція,

в) концентрування,

г) сепарування.

6. Які методи застосовують для виділення білків як цільового продукту?

а) виморожування,

б) висолювання,

в) вакуум-випаровування,

г) кристалізація.

7. Розділення речовин, при якому біомаса спливає на поверхню культуральної рідини, називається:

- а) фіксацією,
- б) фільтрацією,
- в) флотацією,
- г) сепарування.

8. Руїнування зв'язків між носієм і осадженою речовиною та перехід її в рідкий стан - це:

- а) адсорбція,
- б) електрофорез,
- в) елюція,
- г) фільтрація.

9. Розділення речовин, при якому біомаса залишається на поверхні пористої мембрани - це:

- а) фіксація,
- б) фільтрація,
- в) флотація,
- г) сепарування.

10. Найефективнішим методом знешкодження патогенних мікроорганізмів, як відходів біотехнологічних виробництв є:

- а) спалювання,
- б) автоклавування,
- в) виморожування,
- г) хімічна нейтралізація.

11. Які із відходів виробництва біотехнологічних підприємств можна використовувати як кормові добавки або органічні добрива?

- а) біомасу молочнокислих бактерій,
- б) біомасу стрептоміцетів,
- в) відходи пивоваріння,
- г) відходи спиртового виробництва.

12. На чому ґрунтується вибір методів знешкодження твердих відходів біотехнологічних виробництв?

- а) якісний склад твердих відходів,
- б) економічна доцільність,
- в) енергетичні затрати на знешкодження відходів,
- г) технологічне оснащення підприємства.

13. Резервуари із залізобетону, у яких очищення відбувається за допомогою активного мулу в аеробних

умовах, - це:

- а) танкери,
- б) автоклави,
- в) аеротенки,
- г) гідротенки.

14. До складу активного мулу входять:

- а) бактерії та найпростіші,
- б) пробіотики й антибіотики,
- в) живильні середовища та бактерії,
- г) найпростіші та їх фактори росту.

15. Термін БСК означає:

- а) біологічне споживання кисню,
- б) біологічно активні сполуки,
- в) аналізовані тверді залишки,
- г) біохімічне споживання органічного вуглецю.

16. Термін БСК₅ означає:

- а) кількість спожитого розчиненого кисню під час інкубації стоків впродовж 5 днів при температурі 20 °С,
- б) кількість спожитого розчиненого кисню під час інкубації стоків впродовж 5 годин при температурі 20 °С,
- в) кількість спожитого розчиненого кисню під час інкубації стоків впродовж 1дня при температурі 5 °С,
- г) кількість спожитого розчиненого кисню під час інкубації стоків впродовж 5 годин при температурі 5 °С,

17. У складі мікроорганізмів активного мулу зустрічаються види родів:

- а) Pseudamonas,
- б) Bacterium,
- в) Bacillus,
- г) Candida,
- д) Saccharomyces,
- е) Methyloccus

Біотехнологія отримання продуктів мікробіологічного синтезу

1. Доповніть речення:

- а) синтез структурних компонентів мікробних клітин або

продуктів їх метаболізму з низькомолекулярних сполук називається _____;

б) основне завдання мікробного синтезу – це отримання максимум _____ при мінімумі _____.

2. Для досягнення надсинтезу цільового продукту потрібно:

- а) порушувати нормальний перебіг метаболічних процесів,
- б) удосконалювати ростові показники,
- в) підтримувати нормальний перебіг біохімічних процесів.

3. Які методи керування залучають для отримання над синтетиків?

- а) зміна умов культивування,
- б) внесення попередників цільових продуктів,
- в) генно-інженерні методи,
- г) усі перелічені методи.

4. Вкажіть основні групи продуктів мікробного синтезу:

1. _____, 2. _____.

5. Виберіть із наведеного переліку препарати на основі біомаси:

- а) вакцини,
- б) органічні кислоти,
- в) антибіотики,
- г) бактеріальні добрива,
- д) білкові продукти,
- е) екзополісахариди,
- є) продукти бродіння,
- ж) кормові дріжджі,
- з) вітаміни.

6. Виберіть із наведеного переліку продукти метаболізму мікроорганізмів:

- а) вакцини,
- б) органічні кислоти,
- в) антибіотики,
- г) бактеріальні добрива,
- д) білкові продукти,
- е) екзополісахариди,
- є) продукти бродіння,
- ж) кормові дріжджі,
- з) вітаміни.

7. Виберіть із наведеного переліку первинні метаболіти мікроорганізмів:

- а) вакцини,
- б) органічні кислоти,
- в) антибіотики,
- г) бактеріальні добрива,
- д) білкові продукти,
- е) екзополісахариди,
- є) продукти бродіння,
- ж) кормові дріжджі,
- з) вітаміни.

8. Виберіть із наведеного переліку вторинні метаболіти мікроорганізмів:

- | | |
|-----------------------|--------------------------|
| а) вакцини, | б) органічні кислоти, |
| в) антибіотики, | г) бактеріальні добрива, |
| д) білкові продукти, | е) екзополісахариди, |
| є) продукти бродіння, | ж) кормові дріжджі, |
| з) вітаміни. | |

9. Продуцентами основних пробіотиків є бактерії роду:

- | | |
|-------------------------|-----------------------------|
| а) <i>Bacillus</i> , | б) <i>Bifidobacterium</i> , |
| в) <i>Rhizobium</i> , | г) <i>Azotobacter</i> , |
| д) <i>Candida</i> , | е) <i>Saccharomyces</i> , |
| є) <i>Methyloccus</i> , | ж) <i>Lactobacillus</i> , |
| з) <i>Spirulina</i> . | |

10. Продуцентами основних бактеріальних добрив є бактерії роду:

- | | |
|-------------------------|-----------------------------|
| а) <i>Bacillus</i> , | б) <i>Bifidobacterium</i> , |
| в) <i>Rhizobium</i> , | г) <i>Azotobacter</i> , |
| д) <i>Candida</i> , | е) <i>Saccharomyces</i> , |
| є) <i>Methyloccus</i> , | ж) <i>Lactobacillus</i> , |
| з) <i>Spirulina</i> . | |

11. Продуцентами хлібопекарських дріжджів є бактерії роду:

- | | |
|-------------------------|-----------------------------|
| а) <i>Bacillus</i> , | б) <i>Bifidobacterium</i> , |
| в) <i>Rhizobium</i> , | г) <i>Azotobacter</i> , |
| д) <i>Candida</i> , | е) <i>Saccharomyces</i> , |
| є) <i>Methyloccus</i> , | ж) <i>Lactobacillus</i> , |
| з) <i>Spirulina</i> . | |

12. Продуцентами білкових продуктів є бактерії роду:

- | | |
|-------------------------|-----------------------------|
| а) <i>Bacillus</i> , | б) <i>Bifidobacterium</i> , |
| в) <i>Rhizobium</i> , | г) <i>Azotobacter</i> , |
| д) <i>Candida</i> , | е) <i>Saccharomyces</i> , |
| є) <i>Methyloccus</i> , | ж) <i>Lactobacillus</i> , |
| з) <i>Spirulina</i> . | |

13. Вакцини, сконструйовані на основі ослаблених штамів мікроорганізмів, що втратили вірулентність, проте зберігають антигенні властивості, - це:

- а) живі вакцини,
- б) інактивовані вакцини,

в) субклітинні чи субвіріонні вакцини.

14. Вакцини, сконструйовані на основі антигенів, одержаних із мікроорганізмів у різні способи, - це:

а) живі вакцини,

б) інактивовані вакцини,

в) субклітинні чи субвіріонні вакцини.

15. Вакцини, сконструйовані на основі культур патогенних чи вакцинних штамів бактерій і вірусів, що позбавлені життєздатності, але зберігають антигенні властивості, - це:

а) живі вакцини,

б) інактивовані вакцини,

в) субклітинні чи субвіріонні вакцини.

16. Інактивовані вакцини отримують унаслідок дії:

а) температури,

б) ультрафіолетового або іонізуючого опромінення,

в) формаліну чи фенолу,

г) усі перелічені випадки.

17. Інактивовані вакцини отримують на основі:

а) патогенних штамів бактерій і вірусів,

б) так званих «вакцинних» штамів,

в) умовно патогенних штамів,

г) вільноживучих сапрофітних штамів.

18. Для створення специфічного імунітету до збудників гепатиту А застосовують:

а) живі вакцини,

б) інактивовані вакцини,

в) субклітинні чи субвіріонні вакцини.

19. Для створення специфічного імунітету до збудників туберкульозу застосовують:

а) живі вакцини,

б) інактивовані вакцини,

в) субклітинні або субвіріонні вакцини.

20. Укажіть основні особливості мікробного синтезу:

а) синтез здійснюється позаклітинно,

б) синтез здійснюється ферментними системами самої клітин, внутрішньоклітинно,

в) синтез є енергозалежним процесом,

- г) не використовуються високоенергетичні субстрати,
- д) синтез здійснюється низькомолекулярними попередниками,
- е) потребує складних субстратів,
- є) шляхи синтезу пов'язані з процесами катаболізму.

Біотехнологія отримання органічних кислот

1. Основним напрямком використання органічних кислот є:

- а) харчова промисловість – як підкислювачі,
- б) металургія – як окисник,
- в) фармація – як косметичний засіб.

2. Із наведеного переліку мікроорганізмів оберіть ті, що НЕ є продуцентами лимонної кислоти:

- а) *Aspergillus niger*,
- б) *Aspergillus fumigatus*,
- в) *Trichoderma viride*,
- г) *Penicillium janthinellum*,
- д) *Bacillus subtilis*,
- е) *Gluconobacter suboxydans*.

3. Із наведеного переліку оберіть характеристики, що НЕ є визначальними для продуцентів лимонної кислоти:

- а) висока швидкість кислотоутворення,
- б) висока ступінь трансформації джерел вуглецю,
- в) генетична стабільність продуцентів,
- г) низький вихід побічних продуктів синтезу,
- д) швидкі темпи росту,
- е) стійкість до температури.

4. Із усіх можливих продуцентів лимонної кислоти у промислових масштабах використовують _____.

5. Метаболічним шляхом отримання лимонної кислоти є _____.

6. Ключовим ферментом ЦТК, що каталізує утворення лимонної кислоти з оксалоацетату й ацетил-КоА, є:

- а) піруваткарбоксилаза,
- б) цитратсинтаза,
- в) аконітаза,
- г) ізоцитратдегідрогеназа.

7. Назвіть етапи промислового виробництва лимонної кислоти:

1) _____,

2) _____.

8. Ефективний вплив будь-яких факторів, що стимулюють утворення лимонної кислоти, визначається:

а) фізіолого-біохімічними особливостями культури продуцента,

б) дозуванням фактора,

в) технологічними параметрами процесу культивування,

г) складом культуральної рідини.

9. Живильне середовище для росту продуцентів лимонної кислоти повинно містити:

а) джерела вуглецю,

б) джерела азоту,

в) джерела фосфору,

г) мікроелементи,

д) усі перелічені компоненти.

10. Як джерело вуглецю при культивуванні продуцентів лимонної кислоти найчастіше використовується:

а) меляса,

б) гідрол,

г) пшеничні та кукурудзяні висівки,

д) неорганічні солі.

11. Як додаткове джерело азоту при культивуванні продуцентів лимонної кислоти можна використовувати:

а) солі амонію,

б) амінокислоти,

в) сечовину,

г) усі перелічені варіанти.

12. Концентрація азоту у живильному середовищі для культивування продуцентів лимонної кислоти повинна становити:

а) 0,1 – 0,4 г/л,

б) 5 г/л,

в) більше 5 г/л,

г) 1 – 5 г/л.

13. Джерелом фосфору при культивуванні продуцентів лимонної кислоти може виступати:

а) ортофосфорна кислота та її солі,

- б) АДФ чи АТФ,
- в) не потрібно додатково вносити джерела вуглецю.

14. Збільшення рН на стадії синтезу лимонної кислоти:

- а) пригнічує ріст міцелію,
- б) знижує вихід лимонної кислоти,
- в) суттєво не впливає на процес отримання лимонної кислоти.

15. Укажіть тривалість ферментації при поверхневому способі культивування_____та при глибинному способі культивування_____продуцентів під час отримання лимонної кислоти.

16. Із наведеного переліку оберіть переваги поверхневого способу культивування продуцентів лимонної кислоти:

- а) висока концентрація лимонної кислоти у культуральній рідині,
- б) значно менша кількість побічних продуктів,
- в) легше виділити лимонну кислоту із культуральної рідини,
- г) усі перераховані критерії.

17. Переваги твердофазної ферментації лимонної кислоти такі:

- а) низькі затрати на утилізацію відходів,
- б) високий вихід продукту,
- в) низький рівень контамінації,
- г) усі перераховані критерії.

18. При отриманні товарних форм лимонну кислоту з розчину виділяють у вигляді:

- а) цитрату кальцію,
- б) цитрату натрію,
- в) цитрату калію,
- г) цитрату амонію.

Біотехнологія вітамінних препаратів

1. Виберіть одне НЕправильне твердження стосовно вітамінів:

- а) не синтезуються в організмі людини,
- б) містяться в їжі у значно менших кількостях порівняно з

іншими інгредієнтами,

в) виступають попередниками коферментів та інших біологічно активних сполук,

г) виступають джерелами енергії,

д) являють собою низькомолекулярні сполуки.

2. Нижче наведено перелік вітамінів, крім:

а) рибофлавін,

б) α -токоферол,

в) β -каротин,

г) ціанкобаламін.

3. Виберіть одне НЕправильне твердження стосовно основних причин гіповітамінозів:

а) нестача вітамінів у їжі;

б) порушення всмоктування вітамінів у шлунково-кишковому тракті;

в) вроджені дефекти ферментів, що беруть участь у перетвореннях вітамінів;

г) порушення енергетичного обміну організму;

д) дія структурних аналогів вітамінів (антивітамінів)

4. Деякі вітаміни є стабілізаторами біологічних мембран.

Укажіть один із вітамінів, що має таку дію:

а) холекальциферол,

б) токоферол,

в) нафтохінон,

г) пантотенова кислота,

д) рибофлавін.

5. Вітаміни групи А відносять до вітамінів-прогормонів, внаслідок наявності форми:

а) ретинол,

б) ретиналь,

в) ретиноева кислота,

г) ретинілефір.

6. Похідним якої хімічної сполуки є вітамін Д:

а) інозитол,

б) фінгозин,

в) етанол,

г) гліцерил,

д) холестерол.

7. Стан гіпервітамінозу характерний для вітамінів:

- а) А,
- б) В₁,
- в) D,
- г) К,
- д) Е.

8. Первинним акцептором водню при тканинному диханні виступають піридинзалежні дегідрогенази. Який з вітамінів необхідний для утворення відповідного корферменту (НАД+):

- а) В₁,
- б) РР,
- в) В₆,
- г) В₂,
- д) С,
- е) В₁₂.

9. Біотехнологічне виробництво яких вітамінів складається виключно з мікробного синтезу?

- а) тіамін,
- б) рибофлавін,
- в) аскорбінова кислота,
- г) ціанкобаламін,
- д) токоферол.

10. Із наведеного переліку оберіть продуцента віт В₁₂:

- а) *Gluconobacter suboxydans*,
- б) *Ashbya gossypii*,
- в) *Rhodococcus rhodochrous*,
- г) *Propionibacterium shermanii*.

11. Із наведеного переліку оберіть продуцента віт В₃:

- а) *Gluconobacter suboxydans*,
- б) *Ashbya gossypii*,
- в) *Rhodococcus rhodochrous*,
- г) *Propionibacterium shermanii*.

12. Із наведеного переліку оберіть продуцента віт В₂:

- а) *Gluconobacter suboxydans*,
- б) *Ashbya gossypii*,
- в) *Rhodococcus rhodochrous*,
- г) *Propionibacterium shermanii*.

13. Із наведеного переліку оберіть продуцента віт С:

- а) *Gluconobacter suboxydans*,
- б) *Ashbya gossypii*,
- в) *Rhodococcus rhodochrous*,
- г) *Propionibacterium shermanii*.

14. Визначте ферментативну стадію у промисловому хімічному синтезі аскорбінової кислоти:

- а) окислення D-сорбіту в L-сорбозу;
- б) відновлення D-глюкози до D-сорбіту;
- в) окислення D-глюкози до D-глюконової кислоти;
- г) окислення L-сорбози

15. Оберіть правильні характеристики промислового виробництва вітаміну В₁₂:

- а) метод тонкого хімічного синтезу;
- б) використання пропіоновокислих бактерій як продуцентів;
- в) використання метаноутворюючих бактерій як продуцентів;
- г) використання дріжджів *S. cerevisiae* як продуцентів.

16. Нижче наведено перелік промислових продуцентів вітамінних препаратів рибофлавіну крім:

- а) *Ashbya gossypii*,
- б) *Pseudomonas denitrificans*,
- в) *Eremothecium ashbyii*,
- г) *Candida famata*,
- д) *Bacillus subtilis*.

17. Нижче наведено перелік промислових продуцентів вітамінних препаратів ціанкобаламіну, крім:

- а) *Pseudomonas denitrificans*,
- б) *Propionibacterium shermanii*,
- в) *Glucanobacter suboxydans*,
- г) *Methanosarcina barkeri*.

18. Нижче наведено представників роду *Dunaliella*, які використовуються як промислові продуценти β-каротину, крім:

- а) *D. salina*,
- б) *D. viridis*,
- в) *D. tertiolecta*.

19. Синтез якого вітаміну можна прискорити додаванням у середовище гліцину?

- а) тіамін,
- б) рибофлавін,
- в) нікотинамід,
- г) ціанкобаламін.

20. Укажіть шлях отримання препаратів вітаміну D:

- а) хімічна модифікація холестерину,
- б) опромінення ультрафіолетом ергостеролу дріжджів,
- в) опромінення ультрафіолетом холестерину,
- г) хімічна модифікація бічного ланцюга ергостеролу.

Біотехнологія ферментних препаратів

1. Оберіть види сировини, які використовують для виділення ферментних препаратів:

- а) рослинні та тваринні тканини;
- б) рослини та бактерії;
- в) рослини, бактерії та гриби;
- г) гриби та дріжджі;
- д) усі перераховані джерела.

2. Доповніть речення:

- а) більшість ферментів, що синтезуються мікроорганізмами, локалізовані у культуральній рідині і називаються _____;
- б) ряд ферментів, що виділяються із біомаси продуцентів, називаються _____.

3. Виберіть параметри, за яких буде проявлятися максимальна активність ферментів як біологічних каталізаторів:

- а) температура у межах 30 – 70 °С,
- б) температура нижче 30°С,
- в) рН середовища в інтервалі 4,5 – 9,0,
- г) рН середовища 3 – 5,
- д) нормальний атмосферний тиск.

4. Виберіть твердження, що стосуються переваги ферментів у порівнянні з хімічними каталізаторами:

- а) висока каталітична активність,
- б) вибірковість дії або висока субстратна специфічність,
- в) властивий майже 100 % вихід продукту,
- г) можливе багаторазове використання,
- д) можливе перетворення частки субстрату.

5. Виберіть підтвердження переваги мікробіологічного одержання ферментів над тканинним:

- а) швидкий темп розмноження мікроорганізмів,
- б) здатність мікроорганізмів рости на дешевих субстратах,
- в) широкий набір ферментів,
- г) можливість над синтезу,
- д) можливість керування біосинтезом мікроорганізмів,
- е) усі наведені факти.

6. Виберіть переваги та недоліки культивування продуцентів ферментів поверхневим способом:

- а) висока швидкість приросту біомаси,
- б) великі об'єми живильного середовища,
- в) здатність до контамінації,
- г) більша концентрація цільового продукту,
- д) менша кількість операцій при отриманні товарних форм,
- е) великі витрати ручної праці.

Недоліки _____, переваги _____.

7. Першим і обов'язковим етапом отримання товарних форм ферментів є:

- а) розділення культуральної рідини на біомасу та фугат,
- б) дезінтеграція біомаси,
- г) концентрування біомаси,
- д) концентрування цільового продукту,
- е) діаліз.

8. Який етап обов'язковий при отриманні внутрішньоклітинних ферментів?

- а) розділення культуральної рідини на біомасу та фугат,
- б) дезінтеграція біомаси,
- г) концентрування біомаси,
- д) концентрування цільового продукту,
- е) діаліз.

9. Який етап обов'язковий при отриманні екстрацелюлярних ферментів?

- а) розділення культуральної рідини на біомасу та фугат,
- б) дезінтеграція біомаси,
- г) концентрування біомаси,
- д) концентрування цільового продукту,
- е) діаліз.

10. Поясніть, що означають букви і цифри у індексації товарних форм ферментів:

а) ПЗх _____,

б) Г5х _____.

11. Вибір методу виділення й очищення ферменту залежить від:

- а) локалізації ферменту,
- б) сфери застосування,
- в) доступних методів,
- г) тривалості культивування продуцента.

12. Неочищені ферменти препарати, що використовуються у сільському господарстві, одержують:

- а) сепаруванням біомаси бактерій,
- б) висушуванням міцелію з подальшим його перемелюванням із твердим субстратом,
- в) іммобілізацією ферментного препарату,
- д) концентруванням ферментного препарату.

13. Який додатковий етап обробки культуральної рідини залучається при отриманні екстрацелюлярних ферментів?

- а) розділення культуральної рідини на біомасу та фугат,
- б) дезінтеграція біомаси,
- г) концентрування біомаси,
- д) концентрування цільового продукту,
- е) діаліз.

14. Ферменти, які нерозривно пов'язані з нерозчинним носієм, проте зберігають свої каталітичні властивості, називаються:

- а) іммобілізованими,
- б) трансформованими,
- в) концентрованими,
- г) адаптованими.

15. Які переваги мають іммобілізовані ферменти у порівнянні з вільними?

- а) підвищується стійкість ензиму до дії зовнішніх факторів,
- б) змінюється тип каталізованої реакції,
- в) змінюється характер специфічності,
- г) з'являється можливість багаторазового використання.

16. Іммобілізовані ензими у порівнянні з нативними зазвичай:

- а) більш активні,
- б) менш активні.

17. Дайте визначення термінів:

- а) іммобілізований фермент _____,
- б) природні полімерні носії _____.

18. Ферменти застосовують як фармпрепарати. Який механізм дії ферментів у біохімічних реакціях?

- а) знижують енергію активації реакції,
- б) інгібують процес реакції,
- в) змінюють порядок реакції
- г) підвищують енергію активації реакції
- д) змінюють константу швидкості реакції

19. Дегідрогенази – це ферменти, які відщеплюють атоми гідрогену від субстрату. До якого класу ферментів відноситься лактатдегідрогеназа?

- а) трансферази,
- б) ліази,
- в) ізомерази,
- г) гідролази,
- д) оксидоредуктази.

20. Відомо, що визначення ізоферментів ЛДГ використовується в диференціальній діагностиці патологічних станів. За якою властивістю розділяють ізоформи ЛДГ?

- а) електрофоретична рухомість,
- б) розчинність,
- в) гідрофобність,
- г) небілкові компоненти,
- д) гідрофільність.

21. Перетворення сукцинату в фумарат каталізується сукцинатдегідрогеназою. Який конкурентний інгібітор гальмує активність цього ферменту?

- а) піруват,
- б) фумарат,
- в) оксалоацетат,
- г) малінова кислота.

22. Який з перерахованих ферментів гідролізує глікозидні зв'язки вуглеводів?

- а) ліпаза,
- б) α -амілаза,
- в) еластаза,
- г) карбоксипептидаза,

д) трипсин.

Біотехнологія гормонів

1. Назвіть основні етапи технології одержання гормонів за допомогою рекомбінантних ДНК:

- а) _____,
- б) _____.

2. Перелічіть основні методи отримання генетичного матеріалу для подальшої трансформації та синтезу біологічно активних білків:

- а) _____,
- б) _____,
- в) _____.

3. Назвіть функції гормону підшлункової залози інсуліну:

- а) стимулює надходження глюкози у жирову та м'язеву тканини,
- б) підсилює глікогеногенез,
- в) підсилює синтез глікогену в печінці,
- г) знижує рівень глюкози в крові.

4. Оберіть визначення, які правильно характеризують гормон підшлункової залози людини інсулін:

- а) синтезується у вигляді препроінсуліну,
- б) є видоспецифічним білком,
- в) містить 51 амінокислотний залишок в одному поліпептидному ланцюзі,
- г) не містить цистеїну.

5. Оберіть вірні характеристики препаратів інсуліну, що використовуються у медичній практиці:

- а) препарати з підшлункової залози сільськогосподарських тварин,
- б) рекомбінантний людській інсулін,
- в) пептид, одержаний хімічним синтезом,
- г) препарати, одержані усіма зазначеними способами.

6. Укажіть основні недоліки препаратів інсуліну, отриманих з підшлункової залози сільськогосподарських тварин:

- а) здатність викликати алергічні реакції,
- б) відмінність амінокислотного складу порівняно з людським інсуліном,
- в) низька активність отриманих препаратів,
- г) токсичність тваринних препаратів,
- д) висока специфічність людського інсуліну.

7. Укажіть основні новітні методи отримання інсуліну:

- а) хімічний ступінчастий синтез,
- б) модифікації тваринного інсуліну,
- в) генно-інженерні методи отримання інсуліну,
- г) тотальний хіміко-ферментативний синтез,
- е) усі наведені методи.

8. Як можна збільшити вихід інсуліну при мікробному синтезі?

- а) ввести у одну бактеріальну клітину декілька копій рекомбінантної плазмиди,
- б) збільшити титр мікроорганізмів у середовищі,
- в) вносити у живильне середовище амінокислоти,
- г) усі наведені способи.

9. Із наведеного переліку оберіть переваги тотального хіміко-ферментативного синтезу інсуліну:

- а) безпосереднє одержання необхідної послідовності ДНК,
- б) виключений етап одержання гена із природного джерела,
- в) полегшена модифікація гена,
- г) відпадає необхідність модифікації гена,
- д) відпадає необхідність модифікації білкового препарату,
- е) не має значення послідовність ДНК.

10. Оберіть місце синтезу соматотропного гормону (гормону росту):

- а) гіпоталамус,
- б) аденогіпофіз,
- в) нейрогіпофіз,
- г) підшлункова залоза.

11. Із наведеного переліку оберіть сировину для традиційного одержання соматотропіну людини:

- а) гіпофіз великої рогатої худоби,
- б) трупний людський матеріал,
- в) гіпофіз свиней,

г) усі із переліку.

12. Виберіть вірні характеристики соматотропного гормону:

- а) є видоспецифічним білком,
- б) є глікопротеїдом за будовою,
- в) виробляється з гіпофізу великої рогатої худоби як лікарський препарат для людини,
- г) виробляється як рекомбінатний білок в *E.coli*.

13. Стримуючим фактором для отримання хімічним синтезом соматотропного гормону є:

- а) великий розмір молекули соматотропіну,
- б) висока вартість хімічного синтезу,
- в) низька активність соматотропіну, отриманого хімічним синтезом,
- г) токсичність такого препарату.

14. Укажіть характеристики соматотропіну, отриманого мікробним синтезом:

- а) має необхідну молекулярну масу,
- б) не зв'язаний з бактеріальним білком,
- в) наявність залишку метіоніну на N-кінці поліпептидного ланцюга,
- г) усі перераховані особливості.

15. Фактором, що перешкоджає широкому застосуванню соматотропіну в тваринництві, є:

- а) необхідність щоденних ін'єкцій,
- б) акумуляція препарату в сировині подібно до антибіотиків,
- в) великі дози та ,відповідно, великі економічні затрати,
- г) немає стримуючих факторів.

16. Із наведеного переліку виберіть стероїдні гормони:

- а) тироксин,
- б) тестостерон,
- в) прогестерон,
- г) ергостерол,
- д) адреналін.

17. Зазначте функції та властивості гормону кори надниркових залоз кортизолу:

- а) регулює основний обмін,

- б) регулює водно-сольовий обмін,
- в) має протизапальну дію;
- г) не розчинний у воді.

18. Укажіть можливі шляхи промислового виробництва стероїдних гормонів:

- а) трансформація метаболітів вихідної сировини з використанням мікроорганізмів у структурно споріднені сполуки,
- б) мікробіологічний синтез гормонів з ацетил КоА,
- в) тонкий хімічний синтез,
- г) використання фітостеринів, як вихідної речовини.

Культура тваринних тканин і клітин

1. Поняття про гомеостаз вперше сформулював:

- а) К. Бернард,
- б) У. Ру (Роукс),
- в) Г. Келер,
- г) Р. Харрисон.

2. Хто, із зазначених учених, довів можливість необмеженого культивування тваринних клітин в умовах *in vitro*?

- а) Б. Лоеб (Леб),
- б) А. Каррель,
- в) Р. Харрисон.

3. Скільки поділів клітин можна спостерігати при культивуванні пухлинних клітин?

- а) 50 поділів,
- б) 100 поділів,
- в) необмежена кількість поділів,
- г) нездатні до поділу.

4. Як змінюються морфологічний вигляд нормальних клітин при трансформації?

- а) вони стають плоскими,
- б) вони округлюються,
- в) просторово не змінюються.

5. Як змінюються ядерно-цитоплазматичне

співвідношення при перетворенні нормальних клітин у пухлинні?

- а) збільшується,
- б) зменшується,
- в) не змінюється.

6. Із наведеного переліку оберіть вірні характеристики клітин первинної культури:

- а) однорідні,
- б) гетерогенні,
- в) не містять спеціалізованих клітин,
- г) активно проліферують.

7. Укажіть діапазон рН для культивування тваринних клітин:

1) _____.

8. Повітря для культивування тваринних клітин повинно бути:

- а) близьке за складом до атмосферного повітря,
- б) містити 20 % CO₂,
- в) містити 20 % CO₂,
- г) насичене киснем.

9. Яка концентрація живильних елементів у середовищі оптимальна для культивування тваринних культур?

- а) 10³, б) 10⁶, в) 10⁹, г) 10¹².

10. Перевагою фетальної сироватки є:

- а) вміст великої кількості невідомих молекул,
- б) простота отримання,
- в) варіабельність складу,
- г) недостатність специфічних ростових факторів,
- д) цитотоксичність.

11. Постійне надходження свіжого живильного середовища з одночасним відбором культуральної рідини з клітинами характерне для:

- а) періодичної культури,
- б) безперервної культури,
- в) проточної культури,
- г) перфузійної культури.

12. Перші дослідження, що показали можливість культивування тваринних клітин у фізіологічному розчині,

провів:

- а) К. Бернард,
- б) У. Ру (Роукс),
- в) Г. Келер,
- г) Р. Харрисон.

13. Яку із тканин уперше використав Росс Харрісон для культивування *in vitro*?

- а) нервову,
- б) епітеліальну,
- в) оболонки курячого ембріону,
- г) пухлинну.

14. Із наведеного переліку оберіть характеристики трансформованих клітин:

- а) стають залежними від субстрату,
- б) утворюють моно шар,
- в) незалежні від субстрату,
- г) багат шарові культури.

15. Чому після утворення моношару призупиняться поділ клітин у культурі?

- а) спостерігається контактне пригнічення,
- б) конкуренція за фактори живлення,
- в) змінюється форма клітин,
- г) відбувається специфічна організація цитоскелету,
- д) через усі фактори.

16. При трансформації швидкість росту клітин:

- а) не змінюється,
- б) збільшується,
- в) зменшується.

РОЗДІЛ III. ПРИКЛАДИ РОЗВ'ЯЗУВАННЯ ТИПОВИХ ЗАДАЧ

Задача 1.

Умова. Розрахуйте приріст біомаси мікродорості *Dunaliella salina*, якщо відомо, що за 15 діб періодичного культивування кількість біомаси у культурі збільшилась у 7,8 разів від вихідної кількості інокуляту 2 г/л.

Розв'язок. Приріст біомаси у періодичній культурі розраховують за формулою: $\dot{\eta} = (X - X_0)/t$, де:

X – кінцева біомаса у системі культивування (г/л),

X₀ – початкова біомаса (г/л),

t – тривалість культивування (год).

Першочергово розраховують показник біомаси на кінець культивування: 2 г/л x 7,8 = 15,6 г/л, а також тривалість культивування у годинах: 15x24=360 год.

Підставивши отримані значення у формулу для розрахунку приросту біомаси отримаємо:

$$\dot{\eta} = (15,6 - 2) / 360 = 0,038 \text{ г/л/год}$$

Отже, при культивуванні водорості *Dunaliella salina* у періодичній системі культивування приріст біомаси становить 0,038 г/л/год

Задача 2.

Умова. Протягом якого часу культивували *B. subtilis*, якщо відомо, що приріст біомаси становив 0,05 г/л/год, а різниця між вихідною та кінцевою біомасою – 3 г/л.

Розв'язок. Ця задача є оберненою до попередньої. Для її вирішення також застосовуються формула для визначення приросту біомаси:

$$\dot{\eta} = (X - X_0) / t.$$

Звідси видно, що час культивування можна розрахувати за виразом:

$$t = (X - X_0) / \dot{\eta}.$$

Оскільки в умові задачі одразу вказано змінну $X - X_0 = 3$ г/л, провівши прості підрахунки отримуємо:

$$t = 3 / 0,05 = 60 \text{ год.}$$

Отже, саме за 60 годин культивування *B. subtilis* вдалося отримати 3 г/л біомаси культури бактерій.

Задача 3.

Умова. Розрахуйте приріст біомаси бактерій, швидкість експоненційного росту та тривалість подвоєння біомаси для культури з такими вихідними параметрами: час культивування – 5 год, тривалість лаг-фази 0,5 год, концентрація інокулюму 0,5 мг/мл, максимальна концентрація біомаси – 12 мг/мл.

Розв'язок. Швидкість експоненційного росту – це міра швидкості росту клітин в експоненційній фазі. Її визначають за формулою виходячи з початкової та кінцевої біомаси X_0 та X_t у моменти часу t_0 та t :

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0}$$

Тривалість подвоєння визначають за формулою:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Отже, для визначення швидкості експоненційного росту розраховуємо:

$$\mu = (\ln 12 - \ln 0,5) / (5 - 0,5) = 0,706.$$

Звідси час подвоєння біомаси розраховується як:

$$t_d = \ln 2 / 0,706 = 0,982 \text{ (год).}$$

Задача 4.

Умова. Порівняйте продуктивність культури *B. subtilis* за утвореною біомасою за можливих двох способів культивування: у періодичній та безперервній культурі. При цьому процес культивування характеризується такими параметрами: кількість

інокуляту 0,2 г/л, кількість біомаси по закінченню 5-ти добового культивування становить 5,8 г/л.

Розв'язок. Продуктивність за біомасою для культури *B. subtilis* можна розрахувати окремо для обох випадків культивування.

При періодичному культивуванні продуктивність культури за біомасою (Q , г/(л · год)) визначається за формулою:

$$Q_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}$$

Отже, виходячи з даних задачі продуктивність періодичної культури становить:

$$Q = (5,8 - 0,2) / 5 \times 24 = 0,047 \text{ (г/год)}.$$

При безперервному культивуванні продуктивність визначається за виразом:

$$Q = DX.$$

Відомо, що швидкість розбавлення D можна розглядати як частоту оновлення всього об'єму культиватора за одиницю часу, при цьому $\mu = D$, що свідчить про те, що культура досягла динамічної рівноваги. Якщо за постійної швидкості розбавлення D концентрація субстрату у резервуарі підвищиться, то відбувається встановлення нової рівноважної концентрації клітин, але при цьому не збільшується рівноважна питома швидкість росту – μ .

Питома швидкість росту μ визначається за формулою:

$$\mu = \frac{X_t - X_0}{X(t_1 - t_0)}$$

За даної умови питома швидкість росту буде становити:

$$\mu = (5,8 - 0,2) / 5,6 (120) = 0,0083$$

Отже, продуктивність цієї культури за безперервного культивування становить:

$$Q = 0,0083 \times 5,6 = 0,047 \text{ г/год}.$$

Порівнюючи обидва випадки культивування *B. subtilis* відмічаємо, що продуктивність культури не змінюється.

Задача 5.

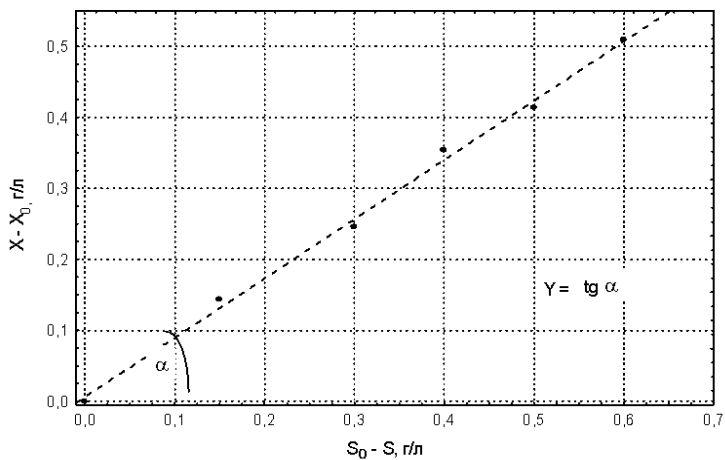
Умова. Культуру клітин кишкової палички *E.coli* вирощували в аеробних умовах на збідненому мінеральному середовищі з глюкозою, що містило в якості єдиного джерела азоту хлорид амонію в лімітуючих рiст концентраціях. Під час експерименту вимірювали концентрацію біомаси клітин і концентрацію субстрату - хлориду амонію. Визначте за представленими даними економічний коефіцієнт Y для хлориду амонію у досліджуваній популяції.

Концентрація NH_4Cl , S г/л	Концентрація біомаси, X г/л	$S_0 - S$ г/л	$X_0 - X$ г/л
0,10	0,08	0,00	0,00
0,25	0,22	0,15	0,14
0,40	0,32	0,30	0,25
0,50	0,43	0,40	0,35
0,60	0,49	0,50	0,41
0,70	0,59	0,60	0,51

Розв'язок. Економічний коефіцієнт Y виражає кількісні потреби організмів (клітин) в живильних факторах і визначається як $Y = dX/dS$, де X і S відповідно концентрації біомаси і досліджуваного субстрату. В умовах лімітованого зростання популяції, коли субстрат вводиться в систему одноразово на початку досліду, економічний коефіцієнт пов'язує концентрацію субстрату і концентрацію біомаси клітин (організмів) співвідношенням:

$$X - X_0 = Y (S_0 - S)$$

Для вирішення завдання потрібно побудувати графік залежності зміни кількості біомаси від зміни кількості лімітуючого субстрату. Експериментальні дані, як видно з рисунка, групуються біля прямої лінії, тангенс кута якої дорівнює шуканому економічному коефіцієнту.



Визначення економічного коефіцієнта Y за даними таблиці.

Таким чином, економічний коефіцієнт для хлориду амонію у досліджуваній популяції кишкової палички дорівнює: $Y = 0.834$ г біомаси на 1г хлориду амонію.

Навчально-методичне видання

Лариса Миколаївна **Чебан**

**Загальна біотехнологія:
Навчально-методичний посібник
Модуль 1**

Відповідальна за випуск *Копильчук Г.П.*
Літературний редактор *Лукул О.В.*