

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет ТВППТСБ

Кафедра біотехнології та біоінженерії

Сільськогосподарська біотехнологія

методичні рекомендації

для виконання лабораторних робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти

**Миколаїв
2023**

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 25.10.2023 р., протокол № 3.

Укладач:

О.І. Каратєєва – канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри біотехнології та біоінженерії,
Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

О. В. Щербак – канд с.-г. наук, професор, декан факультету біотехнологій
Державного Біотехнологічного університету;

О. В. Письменний – канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри ґрунтознавства та агрохімії Миколаївського національного аграрного університету.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
Лабораторна робота № 1. Препарати азотфіксуючих і фосфатмобілізуєчих мікроорганізмів.....	5
Лабораторна робота № 2. Методи контролю розповсюдження шкідників та збудників хвороб рослин	Ошибка! Закладка не определена.
Лабораторна робота № 3. Біотехнологічні основи виробництва препаратів для захисту рослин.....	15
Лабораторна робота № 4. Техніка введення в культуру in vitro і культивування ізолюваних клітин і тканин рослин.....	24
Лабораторна робота № 5. Біотехнологічний контроль відтворення тварин.....	28
Лабораторна робота № 6. Стерилізація обладнання і приготування поживних поживних середовищ для культивування мікроорганізмів	33
Лабораторна робота № 7. Основи культивування мікроорганізмів.....	38
Лабораторна робота № 8. Виділення і концентрація мікроорганізмів та продуктів їх синтезу.....	46
Лабораторна робота № 9. Висушування мікроорганізмів і продуктів їх синтезу..	51
Лабораторна робота № 10. Очищення стічних вод.....	56
Лабораторна робота № 11. Утилізація органічних відходів.....	62
Лабораторна робота № 12. Метаногенез як біоенергетичний процес.....	65
Література	69

ВСТУП

Біотехнологія – це міждисциплінарна галузь, що виникла на стику біологічних, хімічних і технічних наук і яка передбачає використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві. З розвитком біотехнології пов'язують вирішення глобальних проблем людства – ліквідацію нестачі продовольства, енергії, мінеральних ресурсів, поліпшення стану охорони здоров'я і навколишнього середовища.

Біотехнологія у сільському господарстві полегшує традиційні методи селекції рослин і тварин та розробляє нові технології, що дозволяють підвищити ефективність сільського господарства. У багатьох країнах методами генетичної і клітинної інженерії створені високопродуктивні і стійкі до шкідників, хвороб, гербіцидів сорти сільськогосподарських рослин, а також тварини зі зміненою якістю продукції. Розроблена техніка оздоровлення рослин від накопичених інфекцій, що особливо важливо для культур, які розмножуються вегетативно (картопля й ін.). Як одна з найважливіших проблем біотехнології в усьому світі, дослідження можливості керування процесом азотфіксації, зокрема можливість уведення генів азотфіксації у геном корисних рослин, а також процесом фотосинтезу. Досліджується поліпшення амінокислотного складу рослинних білків. Розробляються нові регулятори росту рослин, мікробіологічні засоби захисту рослин від хвороб і шкідників, бактеріальні добрива. Генно-інженерні вакцини, сироватки, моноклональні антитіла використовують для профілактики, діагностики і терапії основних хвороб у тваринництві. У створенні ефективніших технологій племінної справи застосовують генно-інженерний гормон росту, а також техніку трансплантації і мікроманіпуляцій на ембріонах домашніх тварин. Для підвищення продуктивності тварин використовують кормовий білок, вітаміни, антибіотики і пробіотики, отримані мікробіологічним синтезом. Вирішуються проблеми утилізації відходів сільського господарства.

Лабораторна робота №1

Препарати азотфіксуючих і фосфатмобілізуючих мікроорганізмів

Особливістю азотного живлення бобових рослин є їхня здатність вступати в симбіоз із бульбочковими бактеріями, в результаті чого відбувається фіксація молекулярного азоту повітря і, як наслідок, часткове або повне забезпечення рослини-господаря зв'язаними сполуками цього елемента. Бульбочкові бактерії через кореневі волоски проникають у корені, на місці їх проникнення утворюються бульбочки, де саме і відбувається процес азотфіксації. На базі високоефективних і конкурентоспроможних штамів цих бактерій створено спеціальні бактеріальні добрива.

Для кожного виду бобових рослин виготовляють свій препарат на основі специфічного штаму бульбочкових бактерій. Це пов'язано із специфічністю взаємовідносин між рослинами та ризобіями. У разі застосування невідповідного препарату, дія його не проявляється, оскільки штам бактерій не утворює бульбочок із нечутливою до нього бобовою культурою.

Виробництво препарату «Нітрагін»

Перший бактеріальний препарат – нітрагін, який містив чисту культуру бульбочкових бактерій, розробили і впровадили у промислове виробництво німецькі вчені Ф. Ноббе і Л. Гільтнер у 1896 році. У наступні роки під різними назвами препарати бульбочкових бактерій використовували в багатьох країнах.

Для культивування бульбочкових бактерій гороху і люцерни запропоновано середовище наступного складу (%):

- меляса – 1;
- кукурудзяний екстракт – 0,3;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,05;
- K_2HPO_4 – 0,05;
- NaCl – 0,02;
- MgSO_4 – 0,02.

Необхідно зазначити, що складні органічні субстрати часто мають пригнічуючий вплив на бульбочкові бактерії. Наприклад, кукурудзяний екстракт інгібує бульбочкові бактерії за концентрації 1%. Інгібують ріст бульбочкових бактерій також дріжджові екстракти.

Показана можливість культивування бульбочкових бактерій на середовищах, які містять соєве борошно або лактат натрію.

У колишньому СРСР найпоширенішим був торфяний нітрагін або ризоторфін (тепер ризобіот), який містить специфічні бульбочкові бактерії для даної бобової культури.

Виробництво препарату «Азотобактерин»

Азотобактерин містить культуру вільноживучих мікробів роду *Azotobacter*. Для отримання біодобрива на основі, наприклад, *Azotobacter chroococcum* використовують середовище наступного складу (г/л):

- Цукроза – 20;
- K_2HPO_4 – 0,64;
- KH_2PO_4 – 0,16;
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2;
- NaCl – 0,20;
- $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,05;
- Na_2MoO_4 – 0,001;
- $FeSO_4$ – 0,003.

Вирощування біомаси триває 5 діб при температурі 28°C до досягнення титру $5 \cdot 10^7$ кл./мл середовища. З культуральної рідини біомасу видаляють центрифугуванням, отримують суспензію титром $1,0 \cdot 10^9$ кл/г.

До 100 г висушеного гранульованого курячого посліду вологістю 15% додають 100 г суспензії клітин *Azotobacter chroococcum*, перемішують і витримують у вологій камері в аеробних умовах 7 діб при температурі 28°C без перемішування. Після висушування на повітрі впродовж 4 діб до вологості 12% біологічне добриво вносять у ґрунт разом з насінням в кількості 1 кг/м².

Дія Азотобактерину, що випускається в вигляді сухого препарату і застосовується для обробки насіння овочевих культур і розсади, найкраще може проявлятися на нейтральних родючих ґрунтах, досить забезпечених органічними речовинами і фосфором.

Ефективність використання бактеріальних добрив

Бактерії-азотфіксатори, завдяки наявності ферменту нітрогенази, здатні забезпечити себе і всю біосферу доступним азотом у результаті своєї діяльності. Біологічний азот не може нагромаджуватись у ґрунті в надлишкових кількостях, завдяки поступовості процесу азотфіксації впродовж вегетаційного періоду і регулюючої функції корневих виділень рослин, у симбіозі або асоціації з якими бактерії асимілюють молекулярний азот атмосфери і трансформують його в аміачну форму. У подальшому азот частково іммобілізується в тілі мікроорганізму, частково потрапляє у навколишнє середовище, де у вигляді амонійних сполук засвоюється іншими мікроорганізмами і рослинами, які перетворюють його на органічну форму.

Підвищення в урожаї частки біологічного азоту дає змогу значно знизити застосування мінеральних добрив, тому важко переоцінити значимість застосування мікробних препаратів на основі азотфіксуючих бактерій у розв'язанні проблем підвищення продуктивності рослин екологічно безпечними способами.

Симбіотичні азотфіксуючі бульбочкові бактерії бобових культур першими почали використовувати як біодобрива, тому що вони можуть забезпечувати

високий рівень фіксації азоту, наприклад близько 40-70 кг/га у гороху, 300 у сої та 200-350 кг/га на другому році життя – у люцерни.

В Україні найширше використовують для інокуляції насіння вермикулітні препарати бульбочкових бактерій різних бобових культур під загальною назвою ризобіфіт. Передпосівна бактеризація насіння бобових культур особливо високоефективна на ґрунтах, де кілька років не вирощували такі культури, або при вирощуванні бобових культур, що походять з інших континентів, наприклад сої, бульбочкові бактерії якої донедавна не зустрічались у ґрунтах України. Застосування препарату на основі бульбочкових бактерій, селекціонованих за ознаками конкурентоздатності, активності азотфіксації і генетичної спорідненості до сорту і виду рослин, сприяє підвищенню активності азотфіксації у кореневих бульбочках протягом всієї вегетації рослин, інтенсивності фотосинтезу і урожаю (бобових у середньому на 20-35% і збільшує вміст білка в зерні на 5-6%).

Створено препарат бульбочкових бактерій «Сапроніт» на основі сапропелю. Крім того, для сприяння росту багаторічних бобових трав запропоновано препарат «Ризофос»; що містить специфічні для кожного виду рослин бульбочкові та фосфатмобілізуючі бактерії.

Співробітниками Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН розроблено препарат бульбочкових бактерій «Ризобіфіт», який виготовляється в рідкій та торф'яній формах. Незважаючи на можливість добору високоефективних штамів бактерій, які характеризуються широкою сортовою специфічністю, на бульбочкових бактеріях сої показано, що різні сорти цих рослин по-різному реагують на нітрагінізацію. У одних (ранньостиглі сорти Чернятко, Слуна, Юг 30, Аркадія одеська) приріст врожаю зерна становив 21,2-35,9 %, тоді як у інших сортів сої тієї самої групи стиглості (Альтаір, Рассвет, Кріпиш) він досягав 64,2–89,0 %.

На основі бактерій *Azospirillum*, виділених з азотфіксуючих бульбочок шовковиці, створено препарат «Ризобразин». Його застосування значно стимулює ріст рослин і підвищує продуктивність гібридних насаджень шовковиці на 24,2 %.

Ефективним є торф'яний препарат «Діазобактерин», який поліпшує азотне живлення рослин. Він створений на основі бактерій *Azospirillum brasilense* 18-2. Препарат стимулює ріст і розвиток озимого жита, стоколосу, гречки, пожитниці однорічної.

Досить ефективними є препарати на основі вільноіснуючих та асоціативних азотфіксаторів. Одним із перспективних є препарат «Діазофіт» створений на основі бактерій *Agrobacterium radiobacter*. Він підвищує врожайність зерна пшениці на 2,9 ц/га, рису сорту Краснодарський 424 по безазотному фоні – на 4,0-5,5 ц/га, сорту Спальчик – на 12,2 ц/га. По фоні 60 кг/га азоту приріст зерна коливався від 8,0-9,1 ц/га для сорту Краснодарський 424 і близько 9 ц/га – для сорту Спальчик.

Позитивно впливає на ріст і продуктивність рослин рідкий препарат «Агробактерин», основою якого є *Agrobacterium radiobacter* 1333. Він істотно підвищує врожайність кукурудзи і поліпшує якість зерна. На основі *Agrobacterium radiobacter* 2258 СМФ білоруськими вченими розроблено препарат «Фітостимофос». Бактеризація цим препаратом насіння озимого жита збільшувала врожайність зерна на 2,5 ц/га і вміст сирого протеїну в ньому.

На основі штаму *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 створено гранульований препарат «Азогран». Він суттєво стимулює ріст, розвиток і продуктивність ряду овочевих культур, про що детальніше буде надана інформація в наступних підрозділах.

Бактеріальні препарати «Єлена», біологічним агентом якого є *Pseudomonas aureofaciens* ІБ 51, а також «Азолен», основою якого і *Azotobacter vinelandii* ІБ4, стимулюють врожайність злакових культур. Запропоновані препарати виготовляються у вигляді культуральної рідини з титром не нижче 10^9 КУО/мл. Передпосівна обробка біопрепаратами «Єлена» і «Азолен» підвищувала урожайність ярої та озимої пшениці, а також вміст білка в зерні.

Для поліпшення фосфорного живлення рослин і підвищення їх врожайності запропоновано бактеріальні препарати «Поліміксобактерин» (на основі *Paenibacillus polymyxa* КВ) та «Альбобактерин» (на основі *Achromobacter album* 1122). Вони підвищують всхожість насіння, поліпшують фосфорне живлення цукрових буряків, збільшують врожайність на 6-14 % і збір цукру. У ризосфері цукрових буряків, інокульованих препаратом – «Альбобактерином», чисельність фосфатмобілізуювальних бактерій зростала з 7,8 млн/г ґрунту (в контролі) до 16,6 млн/г, а при застосуванні «Поліміксобактерину» – до 20,4 млн/г ґрунту.

Питання для контролю:

1. Яка необхідність використання добрив в агротехнологіях? Наведіть недоліки мінеральних добрив.
2. Назвіть основні етапи виробництва бактеріальних добрив. Охарактеризуйте їх.
3. Наведіть загальну характеристику азотфіксуючих препаратів на основі симбіотичних та вільноіснуючих бактерій.
4. Яка роль бактерій та грибів у живленні рослин фосфором?
5. Які механізми трансформації фосфоровмісних сполук мікроорганізмами Ви знаєте?
6. Особливості мобілізації фосфору ендомікоризними грибами.
7. Охарактеризуйте рідкі і напіврідкі форми бактеріальних добрив.

8. Які наповнювачі використовують при виробництві твердих бактеріальних добрив? Їх переваги та недоліки.

Лабораторна робота №2

Методи контролю розповсюдження шкідників та збудників хвороб рослин

Базові фітопатологічні терміни

Фітопатологія – наука про хвороби рослин, основним завданням якої є пошук шляхів зменшення шкоди, яку патогенні організми спричиняють сільському господарству.

Фітопатогени – організми (гриби, бактерії, віруси), які викликають хвороби у рослин.

Хвороби – порушення нормального обміну речовин у рослині під впливом фітопатогенів або несприятливих умов середовища.

Патогенність – основна властивість фітопатогенних організмів, це здатність викликати пошкодження у зараженої рослини.

Шкідники – види тварин (гризуни, комахи, кліщі, мікроорганізми), здатні заподіяти шкоду рослинам, чагарникам, деревам, продукції рослинного походження, збитки від якої економічно доцільно відвернути.

Фітосанітарний стан – сукупність шкідливих організмів, рівень їх чисельності, інтенсивності розвитку та потенційної загрози.

Епіфітотії – масові захворювання рослин.

Захист рослин – комплекс заходів, спрямованих на зменшення втрат врожаю та запобігання погіршенню стану рослин сільськогосподарського та іншого призначення, багаторічних і лісових насаджень, дерев, чагарників, рослинності закритого ґрунту, продукції рослинного походження через шкідників, хвороби і бур'яни.

Засоби захисту рослин – препарати, які вміщують одну або декілька діючих речовин і використовуються з метою захисту рослини або продукції рослинництва від шкідливих організмів та знищення небажаних рослин або окремих частин рослин.

Методи захисту рослин – способи, за допомогою яких здійснюється захист рослин (організаційно-господарські, агротехнічні, селекційні, фізичні, біологічні, хімічні тощо).

Біологічний контроль – це спосіб контролю за регульованими шкідливими організмами з використанням біологічних контрольних організмів чи їх природних ворогів, антагоністів, конкурентів, що самовідтворюються.

Типи хвороб, які викликають фітопатогени

В'янення – ураження провідної та кореневої системи. Збудник локалізується в судинах і спричинює їх механічну закупорку, а також виділяє токсини і ферменти, що пригнічують рослину.

Гнилі – розм'якшення і руйнування тканин рослини під впливом ферментів патогену.

Плямистості, або некрози – відмирання частіше листової пластинки в місцях проникнення патогену. Уражені ділянки чітко відокремлені від неураженої тканини.

Пустули – випуклі спороношення патогену, вкриті епідермісом або перидермою.

Муміфікації – затвердіння та почорніння ураженого органу.

До перерахованих типів хвороб можна додати надмірне розростання органів рослини (кустистість) та утворення наростів і деформацій (скручування, курчавість, зморшкуватість, нитковидність листя).

Природна регуляція чисельності шкідливих організмів

В екосистемі виділяються окремі біоценози, як взаємопов'язані сукупності рослин-продуцентів, тварин та мікроорганізмів, що виступають у ролі консументів і редуцентів, які населяють ділянку середовища з більш-менш однорідними умовами. В межах конкретного біоценозу особливу увагу привертають явища паразитизму та антагонізму між рослинами-продуцентами і організмами-редуцентами, оскільки на основі глибокого вивчення цих явищ здійснюється цілеспрямоване втручання людини в агроценози для максимального захисту продуцента.

Форми взаємозв'язків організмів у біоценозі надзвичайно складні і різноманітні. В цілому їх можна розділити на дві великі групи: внутрішньовидові та міжвидові відносини.

Симбіоз – взаємодія і співіснування різних біологічних видів. У ширшому науковому розумінні симбіоз є будь-якою формою взаємодії між організмами різних видів, зокрема паразитизм – відносини, вигідні одному, але шкідливі іншому симбіонту. Обопільно вигідний вид симбіозу називають мутуалізмом. Коменсалізмом називають відносини, корисні одному, але нейтральні іншому симбіонту.

Сучасне поняття коменсалізму досить широке і включає до себе інші види взаємодій, під час яких організм-коменсал може отримувати від організму-господаря не тільки їжу, а також захист від ворогів, домівку, використовувати його як транспортний засіб чи опору, не заважаючи господарю.

Деякі біологи вважають, що будь-які досить близькі стосунки між організмами взагалі ніколи не можуть бути повністю нейтральними, і стосунки, які вважаються коменсальними, насправді є мутуалістичними чи паразитичними у якийсь неочевидний спосіб. Наприклад, епіфіти – це насправді «харчові пірати», які перехоплюють значну кількість мінеральних речовин і води, які інакше потрапили б до рослини-господаря. Велика кількість епіфітів також може зламати гілку дерева-господаря чи загородити від нього сонячне світло, заважаючи процесу фотосинтезу в його листі.

Паразитизм – специфічна форма взаємозв'язків організмів різних видів, серед яких один (паразит) перебуває в більш або менш тривалому безпосередньому зв'язку з іншим (господарем, або живителем) використовуючи

його як джерело живлення і життєве середовище, частково чи повністю покладає на нього регуляцію своїх взаємовідносин із довкіллям.

Хижацтво – це така форма взаємовідносин між організмами, коли один з видів (хижак) з метою живлення нападає на іншого (жертву). На кожній жертві хижак перебуває обмежений час, жертва гине відразу ж після його нападу. В деяких випадках дуже важко встановити істотну різницю між паразитизмом і хижацтвом. Наприклад, клоп подізуз живиться як паразит на колорадському жуку і якщо нападає на личинок першого віку, то вони гинуть відразу, разом з тим старші личинки та імаго після нападу клопа зберігають життєздатність.

Серед інших форм взаємовідносин між організмами важливе значення для біометоду має антибіоз. Суть явища антибіозу полягає в тому, що різні види організмів виділяють у навколишнє середовище речовини, що пригнічують або затримують розвиток інших організмів. Серед таких речовин виділяють антибіотики, які продукують різні групи мікроорганізмів, та фітонциди, що виділяють рослини. Антибіотичну дію мають також токсини різної природи, ферменти та деякі інші речовини.

Крім різних форм міжвидових взаємовідносин, що визначають динаміку функціонування біоценозів, для біометоду важливим є також використання даних, пов'язаних з вивченням механізмів передачі інформації на рівні внутрішнього середовища організму і на внутрішньовидовому рівні. На рівні організму передача інформації між органами і тканинами здійснюється різними видами гормонів. Серед гормонів, що застосовуються у біометоді, можна назвати ювенільний (личинковий) гормон, що перешкоджає процесу метаморфозу у комах, екдистероїдні гормони, що ініціюють линьку у комах і беруть участь у процесах регуляції метаморфозу та репродуктивного розвитку. Є також низка інших біологічно активних речовин, зокрема інформони, що забезпечують нормальний перебіг фізіологічних процесів і становлять потенційний інтерес для регулювання чисельності організмів.

Передача інформації на внутрішньовидовому рівні (між особинами одного виду) здійснюється за допомогою феромонів – речовин, що регулюють поведінку, аутоінгібіторів – запобігають перенаселеності при зростанні щільності популяції, аутостимуляторів – стимулюють розвиток і розмноження особин свого виду.

Знання різних форм взаємозв'язків живих організмів у біоценозі та механізмів передачі інформації на всіх рівнях організації живого дають людині невичерпні можливості для специфічного впливу на окремі види фітофагів з метою регулювання їх чисельності в агробіоценозах.

Методи контролю фітопатогенів та шкідників с.-г. рослин

Методи захисту рослин від шкідників і збудників хвороб можна розділити на:

- агротехнічні (сівозміна, терміни і норми висіву насіння, внесення добрив, способи оброблення ґрунту);

- хімічні (використання хімічних пестицидів);
- біологічні (збільшення ефективності природних ентомофагів, інтродукція стійких сортів);
- біотехнологічні (використання біотехнологічних препаратів, отримання безвірусного посадкового матеріалу; підвищення стійкості рослин до шкідників і збудників біотехнологічними методами).

Нагляд за розповсюдженням особливо небезпечних, відсутніх та обмежено поширених на території України шкідників та збудників хвороб рослин покладено на Державну службу з карантину рослин України.

Захист від хвороб складається з комплексу агротехнічних та організаційних заходів, які необхідні для проведення їх перед сівбою, під час вегетації, збору та зберігання врожаю:

- 1) Дотримання чергування культур. На площах, де було сильне ураження, повторний посів проводиться не раніше, ніж через 3-4 роки.
- 2) Застосовування збалансованого комплексу добрив.
- 3) Протруєння насіння перед посівом.
- 4) Видалення уражених рослин.
- 5) Постійна боротьба з бур'янами та комахами, які можуть бути резерваторами патогену.
- 6) Спалення всіх залишків після збирання урожаю та переорювання ділянок.

В багатьох випадках без використання хімічних препаратів неможливо запобігти шкоді від шкідників, хвороб, бур'янів. Використання хімічних препаратів дає швидкий ефект з найменшими витратами часу та коштів, але використовувати такі препарати необхідно лише за умови, коли ступінь розвитку шкідливих організмів значно перевищує економічний поріг та інші заходи виявилися не ефективними. За нераціонального використання пестицидів шкода від них може значно перевищувати корисний ефект.

Сьогодні лише інтегрований захист рослин, який є ідеальною комбінацією біологічних, агротехнічних, селекційно-генетичних, хімічних та інших методів, спрямованих проти комплексу шкідників та хвороб у конкретній еколого-географічній зоні на певній культурі, і при якому здійснюється регулювання чисельності шкідливих видів до економічного порогу шкодочинності і збереження дії природних корисних організмів, ставить надійний заслін перед шкідниками та хворобами сільськогосподарських культур.

Застосування біотехнологічних препаратів для захисту рослин ґрунтується на використанні природних закономірних взаємовідносин між патогенними організмами і сприйнятливими до них макроорганізмами, що забезпечує специфічну вибірковість методу.

Питання для контролю:

1. Хвороби рослин: поняття, причини виникнення, класифікації.

2. Що таке фітопатогени, які вони бувають, як розповсюджуються та проникають у рослини?
3. Поняття, класифікації і проблеми при застосуванні пестицидів.
4. Що таке біологічних захист рослин та які його завдання?
5. Які існують прийоми і методи біологічного захисту рослин та як їх доцільніше застосовувати?

Лабораторна робота №3

Біотехнологічні основи виробництва препаратів для захисту рослин

Вірусні препарати у захисті рослин

На сьогодні в промислових масштабах виготовлення вірусних препаратів здійснюють зараженням господаря вірусом, тому при виробництві вірусних препаратів для захисту рослин виникає першочергова потреба у масовому розмноженні та вирощуванні комах в лабораторних умовах. Виробництво більшості вірусних препаратів базується на вирощуванні комах-господарів на штучних поживних середовищах в лабораторних умовах. Якщо комах-господарів не можливо культивувати в штучних лабораторних умовах (наприклад, пильщиків), то здійснюють збір личинок цих комах в місцях їхнього масового розмноження, дорощування їх на природному кормі, зараження та отримання вірусного інфекційного матеріалу. Отримання в промислових умовах вірусних препаратів складається з трьох блоків (рис. 1):



Рис. 1. **Схема отримання вірусних препаратів для захисту рослин**

Технологія отримання препарату вірин-КС

Виробництво препарату вірин-КС на основі бакуловірусів включає всі етапи характерні для виробництва вірусних препаратів: вирощування комах, культивування в них вірусів, збір гусені, що загинула, виділення біомаси вірусів та приготування препаративної форми.

У якості комахи-господаря використовують капустяну совку (КС). Партію гусені капустяної совки по досягненню нею 4ї вікової стадії інфікують вірусом

ядерного поліедрозу (штам КС-3-86). Для цього штучне поживне середовище обприскують суспензією вірусу КС-3-86 титром $1-2 \cdot 10^7$ поліедрів/мл і згодуюють заражений корм гусіні КС, яку потім утримують при $28 \pm 1^\circ\text{C}$ і вологості 65%. Час інкубування інфікованих гусениць 11-12 діб. При цьому загибель комах становить не менше 75%. Загиблі личинки збирають і заморожують при мінус 20°C протягом 18 годин, ліофілізують і переносять в апарат для видалення ворсин, що є сильним алергеном. Апарат представляє собою спеціальний барабан для стряхування ворсин, які потім видаляють за допомогою вакуумної системи. Позбавлені ворсин ліофілізовані личинки розмелюють для отримання сухого вірусного порошку. У якості наповнювача використовують цеоліт або кремнієву кислоту. Сухий препарат є порошком білого кольору з титром не менше $2-5 \cdot 10^9$ поліедрів/г.

Для оброблення рослин можуть використовуватися препарати, які містять лише вірусні частинки, та комплексні препарати, які крім вірусів містять активатори стресу, у якості якого використовують хімічні інсектициди, гормони та інші агенти.

У якості активатора дії вірусних частинок може бути використана хітиназа. Наприклад, за використання препарату, який містить суспензію вірусу ядерного поліедрозу титром 10^6 вірусних часток/мл і хітиназу в концентрації $2 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$ одиниць активності/мл, латентний період становить 3 доби, а смертність шкідників на 15 добу становить 83-99%.

Препарати для захисту рослин на основі бактерій

Виробництво бактеріальних препаратів для захисту рослин не є складним завданням. Більшість штамів бактерій, що є складовими препаратів, здатні добре рости на штучних поживних середовищах. Культивування бактерій зазвичай здійснюють глибинним способом. Поживне середовище повинно містити всі необхідні для росту продуцента елементи (вода, вуглець, азот, мінеральні солі та інше). Під час культивування необхідно підтримувати оптимальні для росту продуцента умови (рН, температура, аерація тощо). Кінцевий продукт видаляють за допомогою центрифугування, фільтрування, адсорбції.

Технологічні проблеми при виробництві бактеріальних препаратів для захисту рослин найчастіше пов'язані з отриманням, зберіганням та використанням фагостійких штамів продуцентів та створенням препаративних форм, які забезпечують тривале підтримання в активному стані клітин продуцента.

Виробництво препарату Колорадо

Діючою речовиною препарату є штам *Bacillus thuringiensis* H8 (ВКПМ В-6306), що синтезує кристалічний ендотоксин. Токсин є летальним для широкого кола твердокрилих комах, в тому числі колорадського жука.

Для отримання препарату штам *B. thuringiensis* H8 культивують глибинним способом на середовищі наступного складу, г/л:

- кормові дріжджі – 15,0;
- хлористий кальцій – 0,1;
- калій фосфорнокислий однозаміщений – 27,0;
- гідроокис калію – 6,0;
- пропінол Б – 1,0.

Середовище, рН якого має становити 6,5-7,2, стерилізують при температурі 123°C і в асептичних умовах засівають спорами продуцента. Під час культивування обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль за станом продуцента, повнотою споро- та кристалоутворення. Тривалість культивування становить 48-56 годин. Процес завершують коли 50-60% клітин утворили спори.

Після завершення культивування культуральну рідину охолоджують до 18-20°C та передають на етап концентрування.

Концентрування здійснюють шляхом сепарування, центрифугування, мембранної фільтрації або розпилювального сушіння. Вміст токсичного білку в концентраті повинен бути 40-100 мг/г.

Концентрат використовують для виготовлення різних товарних форм інсектицидного препарату. Пастоподібний препарат містить:

- концентрат культуральної рідини – 50-55 %;
- гліцерин – 8-10%;
- масло тридекан – 20-30%;
- спан-60 або неонол – 6-8%;
- амбреїн 0,1 – 0,2%.

Виробництво препарату Лепідоцид

Препарат Лепідоцид застосовується для боротьби з такими комахами-шкідниками як білянки, міль, вогнівки, листовертки, шовкопряди, златогузки, совки, луговий метелик на овочевих, плодових і ефіролійних культурах. Для виробництва препарату може бути використано наступне середовище:

- кормові дріжджі 3%;
- соєве борошно 0,6%;
- крохмаль 0,4%;
- зелена патока 1,3%;
- хлорид кальцію 0,15%.

Посівний матеріал отримують культивуючи спорову культуру *B. thuringiensis* на рідкому середовищі в колбах при температурі 30°C впродовж 48 годин (до завершення спороутворення). Основна ферментація триває 35-40 годин за постійної аерації та перемішування. Культуральну рідину згущують до пастоподібного стану на сепараторі. Пасту висушують на розпилювальній сушарці і змішують з наповнювачем.

При промисловому виробництві препаратів на основі *B. thuringiensis* використовують середовища, які містять кукурудзяний та пшеничний екстракти, кукурудзяне борошно, кормові дріжджі та мелясу.

Виробництво препарату Бактеродентицид

Мишоподібні гризуни завдають не лише значної шкоди сільському господарству, але й є джерелом важких інфекційних та інвазійних хвороб людини та сільськогосподарських тварин. Тому заходам із знищення цих шкідників приділяють велику увагу.

У боротьбі з гризунами застосовують препарат Бактеродентицид, що створений на основі бактерій *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko*, var. *Danysz*, штам 5170 Прохорова. Випускають дві форми препарату – зерновий і амінокістковий.

Бактеродентицид зерновий сухий виготовляють з цілого зерна вологістю не менше 14%. В 1 г сухого препарату міститься 2-3 млрд. спор бактерій. У герметичних банках зберігається до 2 років. Використовують проти мишей і полівок усіх видів навесні, взимку або восени в місцях сезонного скупчення гризунів. У безсніжний період препарат розкладають купками по 5-10 г на стежках гризунів, у нори або під трав'яний покрив. При застосуванні препарату в зимовий період по 1-2 столові ложки його (10-25 г) розфасовують у невеликі паперові пакети, які опускають у пророблені в снігу (до поверхні ґрунту) лунки. У складах з насінневою продукцією, парниках, теплицях дозволено застосування препарату способом розкладання по 5-100 г/м². Строк очікування 8 днів.

Для отримання препарату в промисловості готують посівну культуру штаму *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* N 18/1. Поживне середовище повинно містити автолізат і сірчаноокислотний гідролізат дріжджів, сірчаноокислотний гідролізат рибокісткового борошна, білково-вітамінний концентрат, глюкозу, зелену патоку, крейду та воду. Вміст в ньому водорозчинних вуглеводів повинен бути 2,3% маси, амонійного азоту 0,12% маси. Середовище стерилізують та засівають посівною культурою.

Культивування здійснюють глибинним методом при перемішуванні та аерації при температурі 36°C впродовж 48 годин. Після завершення культивування культуральну рідину змішують з зерном, висušеним в псевдозрідженому шарі при температурі 105°C 24 години, і соняшниковою олією, що є смако-ароматичною приманкою.

Виробництво зернового родентициду можна здійснити і за безпосереднього культивування *Salmonella enteritidis* на зерні. Для отримання препарату згідно з цією технологією якісне зерно пшениці, вівса чи ячменю 3-4 рази промивають і заливають водопровідною водою. Через добу залишок води зливають і зерно промивають ще 2-3 рази та розфасовують по 0,8 1 кг у посуд об'ємом 3 літри. Перед стерилізацією в посуд наливають воду в кількості 10-15% маси зерна. Для підлужнення зерна до рН 7,5-7,6 додають 20%-ний розчин Na₂CO₃ з розрахунку 5 мл на 1 кг зерна. Посудини закривають і стерилізують.

Посівну рідку культуру *Salmonella enteritidis* готують на м'ясо-пептонному бульйоні, гідролізаті кормових дріжджів, рибному гідролізаті. Рідку культуру бактерій висівають у посуд із зерном у боксах. Після висівання посуд добре струшують для рівномірного розподілу бактеріальної культури у масі зерна.

Процес інкубації за температури 37°C триває 2-3 доби. Готовий препарат є вологим набряклим зерном, у якому міститься від 2 до 8 млрд. бактерій на 1 г. Зберігають його за температури 1-10°C безпосередньо в культиваційному посуді.

Бактеродентицид зерновий вологий виготовляють з цілого зерна пшениці, ячменю, вівса, розбухлого від замочування і витримування в автоклаві. Вологість його становить 50-60%. В 1 г його міститься 2,5-5 млрд. спор бактерій. Смертельна доза від 2-3 (для мишовидних гризунів) до 10-20 зерен (для щурів). У герметично закритих банках може зберігатися до 6 місяців.

Бактеродентицид амінокістковий виготовляють при вирощуванні бактерій на рідких поживних середовищах з послідовною сепарацією та змішуванням з кістковим борошном.

Посівну культуру готують зі штаму *Salmonella enteritidis var. Issatschenko (Danitsch-Mereshkovsky)* N 29/1. Поживне середовище містить: солянокислий гідролізат казеїну, білково-вітамінний концентрат, технічну глюкозу, хлорид натрію, крейду, воду. Вміст в ньому водорозчинних вуглеводів повинен бути 3% маси, амінного азоту 0,13% маси. Культивування здійснюють глибинним методом при перемішуванні та аерації при температурі 37°C впродовж 36 годин. Культуральну рідину змішують з борошном, висівками і олією, що є смако-ароматичною приманкою. Суміш екструдують і висушують.

Препаративна форма – гранули сірого кольору вологістю 6%, титр не менше 0,1 млрд/г. Розфасовується по 5 кг в паперові мішки. Перед застосуванням до препарату додають кип'ячену воду (1:1), після чого його змішують з кормом для гризунів і в той же день розкладають. Дозволений для одноразового використання на полях, луках, посівах кукурудзи й соняшнику на силос, у садах, заселених мишоподібними гризунами у формі приманок з вмістом 20% препарату. Норма витрати 0,1-0,4 кг/га. У всіх випадках строк очікування 8 днів.

Технологія виробництва інсектицидного препарату Боверін.

Існує декілька способів вирощування *Beauveria bassiana* для отримання конідій, що є основою інсектицидних препаратів:

- культивування на твердих і рідких стерилізованих середовищах без перемішування і аерації;
- культивування на рідких середовищах без автоклавування, перемішування і аерації;
- комбінований метод, що включає культивування гриба на стерилізованому середовищі з перемішуванням і аерацією, потім вирощування плівок гриба в нестерильних умовах в кюветах.

У якості рідких поживних середовищ, для отримання конідій першим способом, використовують пивне сусло (7% цукристості), картопляний або моркв'яний відвари. Середовище стерилізують автоклавуванням при 110°C 20 хв. Гриб культивують при 18–23 °C. На 7-10 день на поверхні рідкого

середовища утворюється плівка. Після завершення спороутворення (18–25 день) плівку гриба знімають, висушують і подрібнюють. Отриманий порошок змішують з відповідним наповнювачем.

Для вирощування *Beauveria bassiana* на нестерильних поживних середовищах запропоновано введення до їх складу 0,01% стрептоміцину.

Комбінований метод культивування *Beauveria bassiana* включає наступні стадії:

- отримання маточних культур на пшоні,
- вирощування інокуляту в колбах,
- вирощування вегетативної культури гриба в ферментері за аерації і перемішування,
 - розлив рідкої культури в кювети і вирощування спороутворюючих плівок,
 - дозрівання плівок, їх збирання та висушування,
 - подрібнення і виготовлення препаративних форм.

Глибинно-поверхневий спосіб виробництва препарату Боверину запропоновано Інститутом захисту рослин НААН України. Для отримання посівного матеріалу і культивування у ферментері використовують середовище, яке містить сусло, кукурудзяний екстракт, мелясу та мінеральні солі. Посівний матеріал вирощують у колбах при температурі 25-26°C протягом 24-30 годин. Інокулюмом для посівного матеріалу є суспензія конідій з агарової культури або культура, вирощена на пшоні. Використовують посівний матеріал, що містить 100-200 млн. спор в 1 мл. Для ферментера місткістю 50 л беруть 1-2 л посівного матеріалу. Ферментують за перемішування і аерації впродовж 22-28 годин. Наступною технологічною стадією є вирощування гриба поверхневим способом у плоских кюветах, куди культуральну рідину з ферментера наливають шаром 0,7-1,0 см. Вирощування в кюветах ведеться при підвищеній вологості і тієї ж температури. Через 16-18 годин при цьому формується грибна плівка на поверхні середовища. Спороутворення завершується на 35-й день. Для приготування препарату плівку подрібнюють, визначають титр спор і змішують з каоліном.

Технологія виробництва фунгіцидного препарату Триходермін

При виробництві препарату посівну культуру готують із штаму-продуцента *Trichoderma lignorum* ТБД-93. Готують поживне середовище зі складом:

- гліцерин 0,3-2%;
- зелену патоку 0,5-3%;
- гідролізат БВК 3-10%;
- калій фосфорнокислий 0,2-0,6%;
- магній сірчаноокислий 0,3-0,5%;
- амоній азотнокислий 0,3-0,6%.

Потім засівають культурою *Trichoderma lignorum* та культивують при аерації впродовж 3-5 діб. При зниженні рН середовища до 4,5-3,0 додають гліцерин в кількості 0,3-1,0%. Культивування триває до максимального спороутворення.

При виготовленні рідкого препарату культуральну рідину концентрують до вмісту сухих речовин 6-10% та вводять в концентрат 4-10% гліцерину і 1-3% полівінілпіролідону. При виготовленні сухого триходерміну в концентрат культуральної рідини (20-30 % сухих речовин) вводять суміш цеоліту і монтморилоніту та гранулюють отриману суміш.

Для боротьби із збудником сірої гнилі винограду *Botrytis cinerea* можна використати штам *Trichoderma harzianum* Rifai 86 ВКМ F-3272 D. Штам ізольовано з поверхні ягід винограду сорту Мускат і він є активним антагоністом до *Botrytis cinerea*.

Для отримання біомаси грибів *Trichoderma lignorum* можуть бути використані також різні сипучі субстрати: перегній, відходи зерна, буряковий жом, висівки, торф, інші рослинні рештки.

Для отримання триходерміну за поверхневого способу вирощування гриба на сипучих субстратах можна використати будь-яку тару: молочні пляшки, медичні металеві бюкси, емальовані каструлі, дерев'яні ящики, мішки з будь-якої щільної тканини. Тару заповнюють субстратом на третину, зволожують водою (70-80% від маси), щільно закривають і стерилізують в автоклаві за 1,5 атм протягом 1 години. Після стерилізації субстрат охолоджують до 30-35°C і засівають культурою гриба. Засівну культуру *Trichoderma lignorum* вирощують на агаризованих твердих і рідких середовищах (сусло-агар, середовище Чапека, картопляне середовище тощо).

Тару з засіяним субстратом кладуть на стелажі у приміщенні з температурою 25-28°C. У перші 3-4 дні росту гриба особливо важливо підтримувати стерильність у приміщенні і оптимальну температуру повітря. Наступної доби температуру знижують до 20-22°C, щоб запобігти перегріванню субстрату. На шосту-сьому добу росту гриба біопрепарат готовий для застосування. Якщо немає можливості застосувати сирим, його сушать у спеціальних приміщеннях за температури 30-40°C, періодично перемішуючи. Термін зберігання біопрепарату вологістю 50-60% – 25-30 днів.

Використання паразитичних найпростіших у захисті рослин

Усього відомо понад 30 тис. одноклітинних організмів, які належать до царства Найпростіші (*Protozoa*). З них пов'язано з комахами – понад 1500 видів. Для біологічного захисту мають важливе значення невелика кількість, які викликають епізоотії у шкідників, знижують їх плодючість або підсилюють чутливість комах до збудників вірусних хвороб, дії інсектицидів.

Паразитичних найпростіших, як правило, не культивують на штучних середовищах, і масове виробництво препаратів на їх основі передбачає культивування найпростіших на господарях. Найчастіше для виробництва препаратів використовують ентомопатогенні мікроспоридії, які є облігатними внутрішньоклітинними паразитами.

Ряд *Microsporidia* включає облігатних внутрішньоклітинних паразитів, переважно комах, а також ракоподібних та риб. Зараження господарів звичайно відбувається за допомогою спор, що потрапляють в організм з кормом. Крім того передавання паразита можливе й трансваріально. Спори дуже дрібні (2-4 мкм). Найбільше значення для біологічного захисту рослин представляє рід *Nosema*. Відомо понад 200 видів мікроспоридій, які уражують листокруток, біланів, совок.

Технологія нагромадження інфекційного матеріалу аналогічна такій, як і за виробництва вірусних препаратів. При використанні комах підбирають вид, що добре культивується на штучних середовищах, може давати кілька генерацій протягом року за відсутності діпаузи. Личинки комах мають бути достатньо великими і чутливими до патогену. Заражують личинок звичайно через корм. Наприклад, ентомопатогенну мікроспоридію *Vairimorpha* вирощують на гусені дубового шовкопряду.

При виробництві препаративних форм мікроспоридій особливо важливою є розробка прийомів стабілізації інвазійних властивостей спор. Найбільш прийнятним є метод ліофілізації патологічного матеріалу в 50% водному розчині цукрози, який дає змогу стабілізувати інвазійні властивості спор для значно тривалішого зберігання.

У США випускають стандартний інсектицидний препарат Нолобай на основі спор *Nosema locustae* Canning для регулювання чисельності основних видів шкідливих саранових.

Питання для контролю:

1. Характеристика вірусних препаратів для захисту рослин і методика їх отримання.
2. Опишіть особливості використання *Bacillus thuringiensis* у боротьбі зі шкідниками рослин.
3. Охарактеризуйте препарати захисту рослин на основі *Salmonella enteritidis*.
4. Особливості виробництва і застосування препарату Боверін.
5. Надайте характеристику фунгіцидного препарату Триходермін.
6. На скільки безпечним є використання біопестицидів?

Опишіть препаративні форми біопестицидів.

Лабораторна робота №4

Техніка введення в культуру *in vitro* і культивування ізольованих клітин і тканин рослин

Стерилізація експлантів і середовищ

Необхідною умовою роботи з культурою ізольованих тканин є дотримання суворої стерильності. Багате поживне середовище є чудовим субстратом для розвитку в ньому мікроорганізмів, а ізольовані від рослини фрагменти (експланти), які поміщають на поживне середовище, легко уражуються мікроорганізмами. Тому треба стерилізувати як експланти, так і саме середовище. Всі маніпуляції з ізольованими тканинами (введення в культуру, пересадка на свіже поживне середовище) проводять в асептичному приміщенні (ламінар-боксі) стерильними інструментами. Стерильності слід дотримуватися і під час культивування ізольованих тканин, особливо при перепаді температури і вологості, тому що при цьому пробки стають вологими і по них в пробірку можуть проникати мікроорганізми.

Стерилізацію експлантів і насіння проводять, витримуючи їх 5-20 хв. у стерилізуючих розчинах з подальшим багаторазовим промиванням експлантів стерильною водою. Час стерилізації залежить від характеру експлантів і від стерилізуючої активності розчину. Насіння стерилізують 10-20 хв., а вегетативні частини 5-10 хв. Приклади стерилізуючих розчинів наведено в таблиці 1:

Таблиця 1

Стерилізація вихідного рослинного матеріалу (Р. Г. Бутенко, 1990)

Об'єкт	Час стерилізації, хв.			
	діацид 0,1%	сулема 0,1%	гіпо- хлориди (Na, Ca) 5-9%	пероксид водню 10-12%
Насіння:				
- сухе	2-15	10-15	15-20	1-12
- набрякле	6-10	6-8	10-15	6-8
Тканини:				
- м'ясистого кореня, клубні	3-20	15-25	15-20	-
- дерев'янисте стебло	4-20	20-25	20-25	-
Листя	1-3	1-3	3-6	3-5
Апекси	1-10	1-7	3-15	2-7

Органи рослин, з яких беруть експланти для введення в культуру, попередньо мийуть щіткою в мильному розчині і споліскують дистильованою водою, а потім занурюють на кілька секунд у 70%-й етанол. Насіння занурюють у спирт на 1-2 хв. Крім власне стерилізуючої дії спирту обробка тканин етанолом перед приміщенням в основний стерилізуючий розчин підвищує стерилізуючий ефект останнього.

Після стерилізації рослинні об'єкти повинні бути ретельно промиті стерильною водою.

Поверхнева стерилізація звільняє експланти тільки від зовнішньої інфекції. Якщо ж тканини експлантів мають внутрішню інфекцію, то його необхідно

обробити антибіотиками. Особливо багаті внутрішньою інфекцією тканини тропічних і субтропічних рослин з великими судинами. Забруднення культур грибами або бактеріями зазвичай виявляється через 1-14 днів після посадки. Забруднені культури необхідно негайно ж видалити, щоб уникнути зараження повітря у приміщенні.

Поживні середовища стерилізують в автоклаві при температурі 120°C і тиску 0,75-1 атм протягом 20 хв. Якщо до складу поживного середовища входять речовини, що руйнуються при високій температурі, їх піддають холодній стерилізації, пропускаючи через бактеріальні фільтри з діаметром пор 0,22-0,45 мкм, після чого додають в проавтоклавоване охолоджене до 40°C основне середовище.

Посуд, попередньо загорнутий у фольгу або обгортковий папір, стерилізують сухим жаром в сушильній шафі при 160°C протягом двох годин.

Приготування поживних середовищ

Поживні середовища для культивування ізолюваних клітин і тканин повинні включати всі необхідні рослинам макроелементи (азот, фосфор, калій, кальцій, магній, сірку, залізо) і мікроелементи (бор, марганець, цинк, мідь, молібден та ін.), А також вітаміни, вуглеводи, фітогормони або їх синтетичні аналоги. Деякі поживні середовища містять гідролізат казеїну, амінокислоти. Крім того, до складу поживних середовищ входить *EDTA* (етилендіамінтетраоцтової кислота) або її натрієва сіль, які покращують доступність заліза для клітин.

Для отримання калусних тканини в окремих випадках до поживного середовища додають рідкий ендосперм кокосового горіха (кокосове молоко), каштана та ін.

Вуглеводи є необхідним компонентом поживних середовищ для культивування ізолюваних клітин і тканин, оскільки в більшості випадків останні не здатні до автотрофного харчування. Найчастіше в якості вуглеводу використовують цукрозу або глюкозу в концентрації 2-3%.

Фітогормони необхідні для дедиференціювання клітин і для індукції клітинних поділів. Тому для отримання калусних тканин до складу поживних середовищ повинні обов'язково входити ауксини, що викликають клітинну дедиференціювання, і цитокініни, що індукують поділ клітин. У разі індукції стеблевого морфогенезу вміст ауксинів у середовищі може бути знижено або вони можуть бути повністю виключені з поживного середовища.

На безгормональному середовищі ростуть пухлинні і «звиклі» тканини. Автономність по відношенню до обох гормонів або до одного з них пов'язана зі здатністю цих клітин їх синтезувати.

У якості джерел ауксинів у поживних середовищах використовують 2,4-дихлорфеноксоцтову кислоту (2,4-Д), індоліл-3-оцтову кислоту (ІОК), α -нафтилоцтову кислоту (НОК). Для отримання пухкого добре зростаючого калусу частіше застосовують 2,4-Д, оскільки ІОК майже в 30 разів менш активна, ніж 2,4-Д.

У якості джерел цитокінінів в штучних поживних середовищах використовують кінетин, 6-бензиламінопурін (6-БАП), зеатин. Останні проявляють більш високу активність у підтримці зростання ізолюваних тканин і індукції органогенезу в порівнянні з кінетином. До складу деяких середовищ входить аденін.

У даний час відома велика кількість різних за складом поживних середовищ, але найбільш часто застосовувана при вирощуванні ізолюваних рослинних тканин в умовах *in vitro* середовища Т.Мурасіґа і Ф.Скуґа, вперше складена в 1962 р. Це середовище містить добре збалансований склад поживних речовин і відрізняється від інших, як правило, співвідношенням амонійного і нітратного азоту:

Таблиця 2

Склад поживних середовищ для культивування ізолюваних тканин рослин

Компоненти поживного середовища	Концентрація, мл/л			
	Мурасіґа-Скуґа	Гамборґа	Шенка-Хільдебрандта	Грессхофф-Доу
NH_4NO_3	1650	2500	2500	–
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	–	–	300	–
KNO_3	1900	–	–	1000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	200	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	400	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	–	130	–	200
KH_2PO_4	170	–	–	–
Na_2EDTA	37,3	37,3	20,0	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	27,85	15,0	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	–	150	–	90
H_3BO_3	6,2	3,0	5,0	3,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	10,0	10,0	10,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	1,0	3,0
KI	0,83	0,75	1,0	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,1	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,2	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,1	0,25
Гліцин	2,0	–	–	2,0
Мезоінозит	100	100	1000	10
Нікотинова кислота	0,5	1,0	5,0	1,0
Піридоксин – HCl	0,5	1,0	0,5	0,1
Тіамін – HCl	1	10,0	5,0	0,1
2,4-Д	–	0,1-1,0	–	–
Кінетин	–	0,1	0,1	–
Глутамін	–	–	–	2,0
Цукроза	30 000	30 000	30 000	20 000

Для приготування твердих поживних середовищ використовують агар-агар, який являє собою поліцукрид, отриманий з морських водоростей.

З метою раціонального використання часу розчини солей макро- і мікроелементів, а також вітамінів і фітогормонів готують більш концентрованими, що дозволяє багаторазово їх використовувати. Концентровані (маткові) розчини зберігають у холодильнику.

Умови культивування

Для успішного культивування ізолюваних клітин і тканин рослин необхідно дотримуватися певних умов вирощування. Більшість калусних тканин не потребує світла, оскільки не мають хлоропластів і харчуються гетеротрофно.

Виняток становлять деякі зелені калусні тканини, такі, як калусні тканини мандрагори. У деяких випадках калусні тканини, не здатні до автотрофного харчування, все ж вирощують при безперервному освітленні, що є необхідною умовою подальшого успішного морфогенезу, як у люцерни. Більшість же калусних тканин отримують в темряві або при розсіяному світлі.

Детерміновані до морфогенезу тканини переносять на світло і далі культивують їх при освітленості 1000-4000 лк.

Культивування ізольованих меристем і їх мікророзмноження також відбувається при світлі. Освітленість кімнати повинна складати залежно від культури 3000-10000 лк. Необхідно враховувати фотоперіод, який потрібен для даного культивованого об'єкту. Вологість в світловий кімнаті повинна становити 60-70%. Більш сухе повітря сприяє усиханню поживного середовища в пробірках і колбах, якщо вони закриті ватними пробками, зміни її концентрації і порушенню умов культивування. Для підвищення вологості в кімнаті можна використовувати піддони з водою.

Оптимальна температура для більшості культивованих тканин 25-26°C, для культури тканин тропічних рослин вона може досягати 29-30°C. У разі індукції морфогенезу температуру знижують до 18-20°C.

Найкращі світловий і температурний режими, а також режим оптимальної вологості можна створити за допомогою кліматичних камер.

Питання для контролю:

1. Калусна культура: характеристика, властивості, консистенція.
2. Фази росту клітин. Умови і принципи утворення калусних клітин.
3. Спільні і відмінні риси калусних клітин по відношенню до нормальних.
4. У чому полягає суть генетичної гетерогенності калусних клітин?
5. Поясніть причини генетичної нестабільності клітин у культурі.
6. Напрямки використання ізольованих клітин і тканин рослин.

Лабораторна робота №5

Біотехнологічний контроль відтворення тварин

Ендокринний контроль репродуктивної функції у тварин

Передня частка гіпофіза у ссавців секретує три гормони, які надають стимулюючу і регуляторний дію на функцію статевих залоз. До них відносяться: фолікулостимулюючий гормон (ФСГ), лютеїнізуючий гормон (ЛГ) і пролактин, або лютеотропного гормон (ЛТГ), який, як з'ясувалося згодом, проявляє лютеотропні властивості тільки у гризунів.

Рівні секреції гонадотропних і статевих гормонів (рис. 1) є носієм інформації про функціональну активність гіпофізу і статевих залоз на різних стадіях репродуктивного життя тварини, а також важливим критерієм активного контролю (біотехнологічних методів) за ефективністю втручання в процеси відтворення тварин з метою їх регулювання.

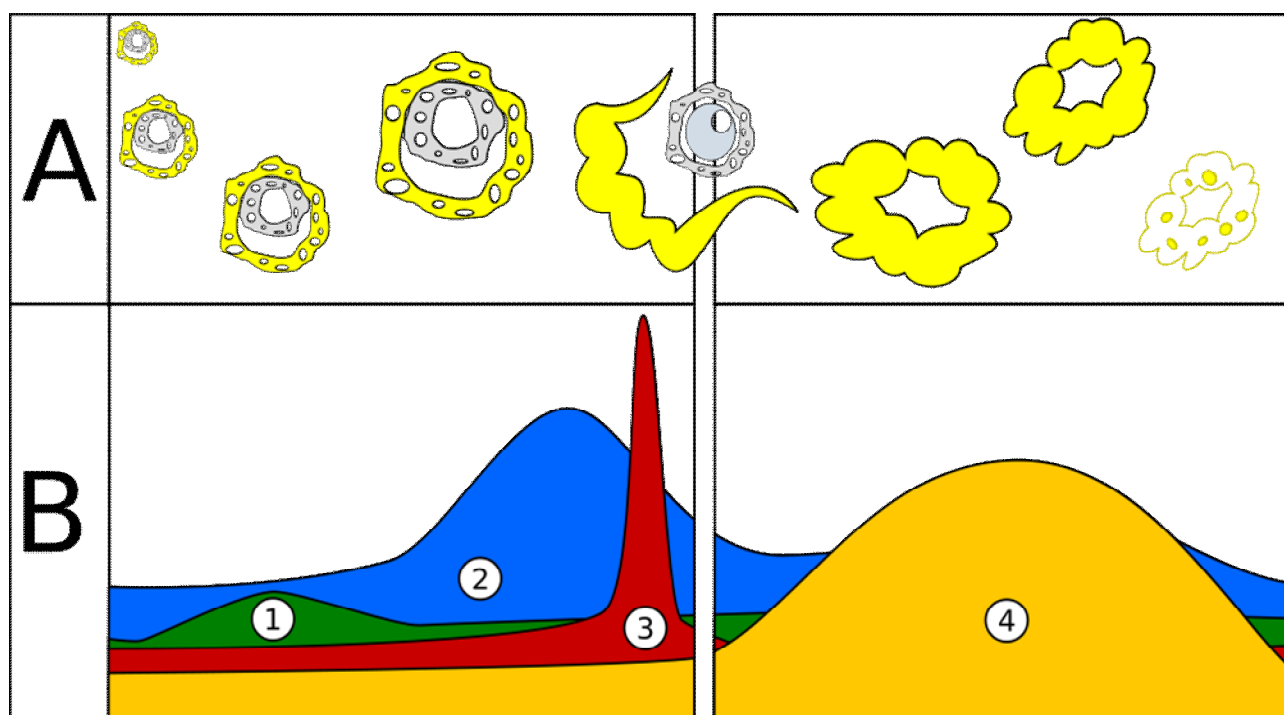


Рис. 2. А: Дозрівання фолікула;

В: Зміна рівня гормонів: 1. Фолікулостимулюючий гормон (ФСГ), 2. Естроген, 3. Лютеїнізуючий гормон (ЛГ), 4. Прогестерон.

Важливою ланкою в розумінні механізму регуляції статевого циклу у тварин є вивчення секреції статевих гормонів яєчників. Виявлено приблизно однакова закономірність зміни рівня статевих гормонів в крові основних видів сільськогосподарських тварин. Наприкінці статевого циклу відбувається різке падіння рівня прогестерону. Слідом за цим спостерігається швидкий ріст концентрації естрогенів.

Ріст рівня естрогенів характеризує їх як фізіологічний фактор, стимулюючий виділення ЛГ, який в свою чергу необхідний для овуляції.

Зі зменшенням концентрації естрогенів у крові їх гальмівна дія знижується, що сприяє виділенню обох гонадотропінів, росту та розвитку фолікулів; новий короткий підйом рівня естрогену в крові перед овуляцією повторно стимулює передовуляторний викид ЛГ.

Одним з вагомих надбань другої половини ХХ ст. було відкриття гонадотропін-релізінг гормону (ГН-РГ), або гонадоліберину, контролюючого гонадотропну функцію гіпофізу. Здійснюється це таким чином: нервові закінчення з гіпоталамусу виділяють нейрогормональні речовини в капіляри первинного сплетення портальної системи в серединному підвищенні, і ці нейрогормони переносяться вниз через гіпофізарну ніжку в синуси передньої долі гіпофіза і впливають на секреторну активність гіпофізарних клітин. Завдяки тому, що нейросекреторні клітини поєднують нервову й ендокринну функції, в гіпоталамусі відбувається перемикання початкового нервового імпульсу в гуморальні ланки еферентних ланцюгів.

Була встановлена структура ГН-РГ, який складається з 10 амінокислот (декапептид), та ідентичність його у тварин різних видів. Відсутність видоспецифічності ГН-РГ, на відміну від гіпофізарних гонадотропінів, і його нескладна структура привернули увагу дослідників у плані його хімічного синтезу і застосування для регулювання термінів овуляції у тварин. Незабаром він був синтезований і створені його аналоги, зокрема, сурфагон.

Ще одне відкриття в області біології розмноження тварин другої половини ХХ ст. стосується лютеолітичного фактору, простагландину F-2 α . Багатьма дослідниками було встановлено, що після видалення матки жовте тіло функціонує протягом тривалого часу, і це є переконливим доказом існування літичного фактора в матці. Було встановлено, що матковий лютеолізін переноситься з яєчником вени в яєчникову артерію, що близько розташована, за допомогою механізму зворотного струму і транспортується прямо через артеріальну кров у яєчник.

У корів, свиней і вівць ПГФ_{2 α} виділяється з матки у вигляді викидів хвилеподібно, кожен тривалістю кілька годин і з певними інтервалами часу. Регресія жовтого тіла зазвичай настає через 2 доби після початку виділення ПГФ_{2 α} , охота проявляється через 24-48 годин після регресії жовтого тіла.

Регулювання статевого циклу у тварин

Метод регулювання часу приходу в охоту груп тварин у визначені терміни – **синхронізація охоти**. Це відкриває цілий ряд переваг для організації системи ведення тваринництва. Терміни проведення штучного осіменіння можуть бути значно скорочені, а це означає, що час, який витрачається на виявлення охоти, може бути значно зменшено або принаймні суворо лімітовано, а отже, знижені трудові витрати у зв'язку з укороченням періоду виявлення охоти і штучного осіменіння. Більш того, якщо метод забезпечує точний час овуляції, то можливо запліднення без виявлення охоти, тобто у фіксований час. У результаті виключається можливість проведення осіменіння в неоптимальні

терміни і старіння зигот, з одного боку, і зменшуються трудові витрати на виявлення тварин в охоті, з іншої.

Способи синхронізації статевої охоти і овуляції у тварин засновані на двох основних підходах.

Перший підхід заснований на видаленні або припиненні функції жовтого тіла. У результаті цього всі тварини відповідної групи вступають у фолікулярну фазу статевого циклу одночасно і таким чином одночасно приходять у стан статевої охоти. З цією метою широке застосування знайшов так званий лютеолітичний фактор простагландин F-2a (ПГФ_{2a}).

Накопичені дані про нейроендокринну регуляцію статевого циклу у тварин створили наукову основу і для другого підходу до синхронізації охоти, заснованого на гальмуванні розвитку фолікулів в період штучного подовження лютеїнової фази циклу до такої тривалості, поки не відбудеться регресія жовтого тіла у всіх оброблених тварин. Припинення впливу інгібуючого фармакологічного агента супроводжується ростом і розвитком фолікулів у всіх тварин і приведенням їх одночасно у фолікулярну фазу циклу з подальшим синхронним проявом охоти і овуляції. Більшість способів синхронізації охоти, заснованих на цьому підході, базуються на застосуванні прогестерону або його синтетичних аналогів – прогестагенів. Введення останніх протягом декількох днів забезпечує прояв статевої охоти одночасно у всіх тварин після закінчення обробки незалежно від того, в якій фазі циклу вони перебували на початку обробки.

Оцінка якості ембріонів

Як правило, лише частина вимитих ембріонів придатна для трансплантації. Тому їх необхідно оцінити за деякими морфологічними ознаками. За життєздатністю ембріони ділять на п'ять категорій:

- I – відмінні, ідеальні, відповідають дню вимивання, однорідні, округлої форми з непошкодженою прозорою оболонкою, чіткими, однаковими за величиною бластомерами;
- II – добрі, у яких декілька клітин відокремлені від загальної маси, бластомери неоднакові за величиною, розміщені щільно й несиметрично;
- III – задовільні, неоднорідні, в перивітеліновому просторі можуть бути включення (відокремлені клітини), бластомери частково ущільнені;
- IV – незадовільні, що мають зону пелюциду не округлої форми, наявність дегенерованих клітин, порушення зв'язку між бластомерами – ущільнення й зморщення бластомерів;
- V – дегенеровані, які не відповідають стадії розвитку ембріона. На 7-й день мають 8 бластомерів, спостерігається дефект прозорої оболонки, значне ущільнення бластомерів.

Життєздатність ембріонів можливо оцінити в період їх культивування у спеціальних середовищах (199, Хема-10, Дюльбекко) при температурі +37°C. Також, можна використовувати метод фарбування, що ґрунтується на різному

ступені проникнення барвників через прозору оболонку живих або загиблих ембріонів.

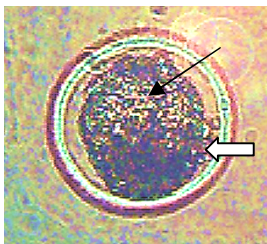
Після вимивання із статевих шляхів самок зародки оцінюють і визначаючи їх якість (рис. 2). Зародки відмінної, доброї, а у ряді випадків і задовільної якості відбирають для пересадки реципієнтам. Використовують як щойно одержані, так і заморожено-розморожені зародки.



Ембріон великої рогатої худоби відмінної якості на стадії пізньої морули. Сполучення клітин у ембріоні правильне, крайні бластомери однакової величини, клітинні межі чіткі. Збільшення в 100 разів.



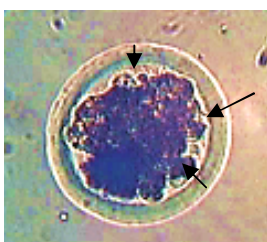
Ембріон великої рогатої худоби відмінної якості на стадії розширеної бластоцисти. Ембріобласт чітко відмежований (стрілки). Збільшення в 100 разів.



Ембріон великої рогатої худоби доброї якості на стадії ранньої бластоцисти. Відділено близько 10 % розрихлених бластомерів (біла стрілка). Відмічено початок закладки порожнини бластоцисти (стрілка). Збільшення в 100 разів



Ембріон великої рогатої худоби задовільної якості на стадії пізньої морули. Відмічено розрихлені клітинні комплекси (стрілки). Збільшення в 100 разів.



7-денний ембріон великої рогатої худоби на стадії ранньої морули. Прогресуюча дегенерація – фрагментація та лізис окремих бластомерів (стрілки). Значне відставання у розвитку. Непридатні для пересадки реципієнтам. Збільшення в 100 разів.

Рис. 3. Ембріони великої рогатої худоби різній якості (надані С.І.Ковтун, 2009 рік)

Питання для контролю:

1. Охарактеризуйте особливості стимуляції суперовуляції та вилучення ембріонів.
2. В чому суть короткочасного і тривалого зберігання ембріонів та які нюанси їх пересадки домашнім тваринам?

3. Які особливості запліднення яйцеклітин *in vitro*.
4. Що таке химерні тварини та як їх отримують?
5. Клонування: поняття, різновиди, цілі, проблеми.

Лабораторна робота №6

Стерилізація обладнання і приготування поживних середовищ для культивування мікроорганізмів

Стерилізація обладнання та очистка повітря

Усі процеси мікробіологічного синтезу проводять з чистими культурами мікроорганізмів. Чистота посівних і готових культур є основною умовою виробництва біопрепаратів.

До першочергових заходів відносяться: стерилізація устаткування і комунікацій; забезпечення їх герметичності; очищення та стерилізація повітря, що подається в апарат; стерилізація поживних середовищ; спеціальні методи відбору проб та їх аналіз; внесення до апаратів-культиваторів поживних речовин, піногасників, посівного матеріалу і власне процес вирощування.

Необхідність забезпечення асептичних умов в біотехнологічних процесах продиктована цілою низкою чинників:

- сторонні мікроорганізми (контаміанти) споживають компоненти поживних речовин середовища;
- розвиток контаміантів супроводжується виділенням метаболітів, що неконтрольовано впливає на умови росту та розвитку основної культури;
- наявність у культуральній рідині сторонньої мікрофлори та продуктів її життєдіяльності ускладнює виділення цільового продукту і знижує його якість.

Стороння мікрофлора може потрапляти з поживним середовищем, водою, добавками, повітрям, що подається для барботування, або з навколишнього середовища з будь-яким з видів сировини, а також при взятті проб на аналіз.

Методи, застосовувані для виключення попадання в культуру сторонньої мікрофлори, засновані на затримці або знищенні мікроорганізмів. Домогтися необхідної чистоти речовин можливо встановленням фізичної перешкоди для мікроорганізмів або знищивши їх до подачі в стерильний об'єкт.

До способів, заснованих на принципі затримки мікроорганізмів, відносять стерилізуючу фільтрацію повітря і рідин, герметизацію технологічного устаткування і комунікацій. Стерилізуюча фільтрація забезпечує повну або часткову затримку мікроорганізмів. Він широко застосовується для очищення газів (аеруючого повітря) і рідин (головним чином, на кінцевих стадіях виробництва фармацевтичних препаратів).

До способів стерилізації, заснованих на знищенні мікроорганізмів, відносять термічну, хімічну та радіаційну стерилізацію, яку застосовують для знезараження устаткування, комунікацій, поживних середовищ, відходів та інших технологічних рідин.

Термічна стерилізація заснована на тому, що при високих температурах гинуть як вегетативні клітини, так і спори мікроорганізмів. Режим стерилізації залежить від виду мікроорганізмів, їх властивостей, складу та інших факторів. Також практичне застосування термічної стерилізації пов'язано з характеристикою об'єкта, що стерилізується. Так, порожні апарати та комунікації найчастіше стерилізують насиченою водяною парою, поживні середовища та інші рідини – шляхом нагрівання під тиском, в ряді випадків застосовують гаряче повітря (сухий жар).

Найбільшим бактерицидним ефектом володіє насичена водяна пара, що подається під тиском. При стерилізації паром час загибелі спор, найбільш стійких термофілів, становить 25 хв. при 121°C, 4 хв. – при 132°C, тоді як при використанні сухого повітря спори гинуть за 60 хв. при 160°C, при 180°C – за 10 хв. Інактивація таких спор в киплячій воді при 100°C відбувається надзвичайно повільно – вони гинуть через 7-10 год.

Сухе гаряче повітря використовують для стерилізації матеріалів і предметів, які можуть бути зіпсовані при обробці паром: безводні жири, масла, порошки, предмети, схильні до корозії.

Хімічну стерилізацію застосовують для тих елементів обладнання, які не витримують нагрівання до 130°C, до їх числа відносяться датчики, повітряні фільтри. У якості агентів хімічної стерилізації використовують формальдегід, оксид етилену, перекис водню, луги, спирти, кислоти.

Радіаційна стерилізація викликає загибель мікроорганізмів за рахунок впливу іонізуючого випромінювання. В силу багатьох технічних причин цей спосіб поки не знайшов широкого застосування в мікробіологічній промисловості.

Основною вимогою до технічних систем очищення і стерилізації повітря на біопідприємствах є очищення його від мікрофлори та інших домішок. Окрім забезпечення цієї вимоги, розглянуті системи повинні забезпечувати отримання повітря з певними термодинамічними характеристиками (температура, вологість, тиск), від яких, в кінцевому рахунку, залежить ефективність роботи систем в цілому.

Повітря, яке відводиться від устаткування, лабораторних і виробничих приміщень також повинне підлягати очищенню від присутніх у ньому мікроорганізмів і контролюватися на чистоту.

Ефективність роботи фільтрів для стерилізації повітря визначається наступними факторами: ефективність і механічна міцність фільтруючого матеріалу; герметичність кріплення фільтруючого матеріалу в корпусі фільтру; зручність і швидкість зміни фільтра.

Характеристика поживних середовищ для культивування мікроорганізмів

Всім організмам властивий постійний обмін речовин з навколишнім середовищем. Для здійснення процесів живлення і розмноження необхідні певні умови і, в першу чергу, наявність поживних матеріалів, з яких мікроби синтезують складові частини і отримують шляхом окислення необхідну енергію. Поживне середовище повинно містити джерела азоту, вуглецю, водню і кисню; неорганічні сполуки у вигляді різних солей; бактеріальні вітаміни або так звані «фактори росту»; воду.

Однак наявність всіх зазначених субстратів саме по собі, без урахування фізико-хімічних показників середовища, не забезпечує оптимальних умов для існування мікроорганізмів. Такими показниками є: рН середовища; окислювально-відновний потенціал; в'язкість; щільність; вологість; осмотичні властивості.

Оскільки види бактерій характеризуються значними відмінностями в обміні речовин, то природно, що для їх вирощування використовуються різні поживні середовища. При їх складанні особливо важливе значення має питання про джерела вуглецю та азоту, так як кисень, водень і сірка можуть споживатися мікроорганізмами з води і сульфатів.

Поживні середовища поділяють за консистенцією на рідкі, напіврідкі і щільні (тверді). Зазвичай до щільних відносять агаризовані середовища, хоча у якості ущільнюючих можна використовувати й інші речовини (желатин, агар-агар, силікагель, карбоксиметилцелюлоза та ін.). До них належать також згорнута сироватка, згорнутий яєчний білок тощо. На щільних середовищах легше проводити бактеріологічні дослідження культур, легше виявити зараження сторонньою мікрофлорою і виділити чисту культуру з окремих колоній. Такі середовища, як правило, застосовуються для зберігання мікроорганізмів.

Рідкі середовища використовують для проведення більш точних досліджень, їх складом простіше варіювати.

За складом поживні середовища поділяють на прості або звичайні (пептонна вода, м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний агар) і складні, політропні, або спеціальні (кров'яний агар, асцитичний агар і бульйон, згорнута сироватка).

За призначенням поживні середовища поділяють на диференційно-діагностичні, селективні, елективні, інгібіторні, накопичувальні, індикаторні, середовища для консервування.

Диференційно-діагностичні – це складні середовища, на яких мікроорганізми різних видів ростуть по-різному залежно від біохімічних властивостей культури.

Селективні, інгібіторні і елективні середовища призначені для вирощування суворо певного виду мікроорганізмів. Для інших вони несприятливі або недостатньо сприятливі. Ці середовища слугують для виділення бактерій зі змішаних популяцій і диференціювання їх від схожих видів. До їх складу додають різні речовини, що пригнічують ріст одних видів і не впливають на інших.

Консервуючі середовища, як правило, слугують для первинного посіву та транспортування досліджуваного матеріалу.

Накопичувальні середовища (збагачення, насичення) – це середовища, на яких певні види культур або групи культур ростуть швидше й інтенсивніше супутніх. При культивуванні на цих середовищах створюють умови, сприятливі для певного, присутнього в суміші виду. Основою середовищ накопичення дуже часто є жовч і її солі, тетратіонат натрію, різні барвники, селенітові солі, антибіотики тощо.

За складом середовища бувають натуральні, синтетичні і напівсинтетичні.

Натуральні середовища – природні, комплексні, органічні середовища невідомого або невизначеного складу – включають різні речовини рослинного і тваринного походження. До них відносяться пептони, кров, екстракти, сусло, молоко, сироватка, картопля тощо.

Синтетичні середовища готують з точно визначених кількостей органічних і неорганічних хімічних сполук відомого складу і води. Перевага синтетичних середовищ – постійний склад і відтворюваність. Однак, як правило, в них потрібно вносити різні добавки, зокрема фактори росту.

Напівсинтетичні середовища, крім органічних і неорганічних речовин відомого складу, містять в незначних кількостях продукти природного походження. Прикладом може бути картопляне середовище з глюкозою, склад якої залежить від сорту та віку картоплі. Так, зміст аспарагіну і глутаміну в бульбах різних сортів картоплі може відрізнятися більш ніж у двічі.

Вибір сировини для приготування поживних середовищ

Основним принципом конструювання поживного середовища є вибір сировинних джерел, тобто поживної основи. Якість середовища багато в чому визначається повноцінністю складу поживних субстратів та вихідної сировини. Визначальну роль при цьому грає насамперед біохімічний склад сировини, від якого залежить вибір способу і режимів її переробки з метою найбільш повного і ефективного використання поживних речовин.

Для отримання поживного середовища з особливо цінними властивостями використовують насамперед традиційні джерела білку тваринного походження – м'ясо ВРХ, казеїн, рибу та продукти її переробки (кілька, сухий криль, минтай і його перезріла ікра). Великого поширення набуло рибне кормове борошно, яка задовольняє вимогам біологічної цінності, доступності і відносній стандартності.

Широке поширення одержали поживні середовища на основі казеїну, який містить усі компоненти, наявні в молоці: жир, лактозу, вітаміни, ферменти і солі.

З нехарчових джерел білка тваринного походження як сировину для конструювання повноцінних поживних середовищ необхідно виділити кров забійних тварин, яка багата біологічно активними речовинами і мікроелементами і, крім того, містить продукти клітинного і тканинного обміну. Гідролізати крові сільськогосподарських тварин використовуються як замітники пептону в диференційно-діагностичних середовищах.

До інших видів сировини, що містить білок тваринного походження відносяться: плацента і селезінка ВРХ, сухий білковий концентрат – продукт переробки м'ясних відходів, відходи, отримані при обробці шкіри, ембріони домашніх птахів – відходи вакцинного виробництва, кровозамінники з вичерпаним терміном придатності, сирна сироватка, м'які тканини моллюсків і ластоногих, м'ясо тушок хутрових звірів.

Поживні середовища, виготовлені із сировини тваринного походження, мають високий вміст основних поживних компонентів, є повноцінними і збалансованими за амінокислотним складом, досить добре вивчені і описані в літературі.

З продуктів рослинного походження в якості білкового субстрату для поживних середовищ використовують кукурудзу, сою, горох, картоплю тощо. Однак рослинна сировина містить білок, незбалансований склад якого залежить від умов вирощування культур, а також ліпіди в кількостях, більших ніж в продуктах тваринного походження.

Велику групу становлять поживні середовища, виготовлені з білкової сировини мікробного походження (дріжджі, бактерії тощо). Амінокислотний склад мікроорганізмів, що слугують субстратом для приготування середовища, добре вивчений, і можна лише підкреслити, що біомаса використовуваних мікроорганізмів є повноцінною за складом поживних речовин і характеризується підвищеним вмістом лізину і треоніну.

Розроблено цілий ряд поживних середовищ комбінованого складу з білкових субстратів різного походження: дріжджово-казеїновий, дріжджово-м'ясний тощо. Основою більшості відомих поживних середовищ є гідролізати казеїну, м'яса ВРХ і риби (до 70%). Питома ж вага нехарчової сировини в технології конструювання поживних середовищ складає всього 30% і надалі збільшуватиметься.

Питання для контролю:

1. В чому полягає необхідність стерилізації обладнання та очистки повітря?
2. Методи стерилізації та їх характеристика?
3. Види поживних середовищ для культивування мікроорганізмів та їх характеристика.
4. Характеристика сировини для приготування поживних середовищ.

Лабораторна робота №7

Основи культивування мікроорганізмів

Характеристика штамів мікроорганізмів для створення вакцин

Для здійснення будь-якого біотехнологічного процесу необхідні культура мікроорганізмів, поживне середовище, апаратура для вирощування та проведення допоміжних операцій, засоби контролю і керування.

Еталонні або референтні штами зберігаються і підтримуються в спеціальних лабораторіях. Такі штами, у свою чергу, є виробничими, оскільки на їх основі готуються вакцини. При цьому інактивовані вакцини, як правило, готуються з високовірулентних штамів, а живі вакцини – з атенуйованих (ослаблених), авірулентних штамів.

Поряд з виробничими, еталонними штамми зберігаються контрольні штами, які використовують для оцінки якості вакцинних препаратів. Ці штами повинні бути генетично однорідними популяціями мікроорганізмів зі стабільно високими антигенними та імуногенними властивостями.

Антигенні властивості штамів оцінюються за титром антитіл у сироватці крові чутливих тварин через певні терміни після введення їм мікроорганізмів. *Імуногенні властивості* штамів визначаються стійкістю щеплених тварин до зараження збудником хвороби певною дозою контрольного (вірулентного) штаму і виражають 50%-ю дозою імуногенності (ImD_{50}) або за наростанням титру антитіл в сироватці крові. При цьому 80% щеплених тварин повинні бути специфічно несприйнятливими до інфекції.

Виробничі, еталонні штами повинні зберігати генетичну стабільність антигенних, імуногенних та інших притаманних їм біологічних властивостей протягом 10 послідовних пересівань як *in vivo*, так і *in vitro*.

Фази росту і розмноження мікроорганізмів

Динаміка росту і розмноження мікроорганізмів має ряд спільних особливостей для бактерій, актиноміцетів, мікроскопічних грибів, мікоплазм та інших про- і еукаріот. При індивідуальному розвитку їм властива висока швидкість розмноження. Розвиток відбувається у вигляді послідовних фаз, характер і тривалість яких залежать від фізіологічного стану клітин, що визначається в свою чергу умовами різноманітних факторів середовища, в якому розвивається популяція того чи іншого організму.

Ріст мікробної популяції зображують зазвичай графіками, позначаючи на вісі абсцис час росту, а на вісі ординат – число мікробних клітин. Кожна фаза є адитивним виразом розмноження і відмирання клітин мікробної популяції.

Кожна фаза росту і розмноження мікроорганізмів характеризується наступним чином:

1. *Вихідна фаза* або *фаза затримки росту (лаг-фаза)*. Тривалість цього періоду для більшості мікроорганізмів становить 2 години та залежить від температури, складу поживного середовища, якості посівного матеріалу. Число клітин залишається постійним через відсутність в цей період клітинного поділу. Загальний стан мікробних клітин характеризується як стан пристосування до поживного середовища. У цей період посилюється синтез речовин, клітини збільшуються в розмірі.
2. *Фаза логарифмічного (лог-фаза) або експоненційного (показникового) росту* характеризується постійною і максимальною швидкістю росту клітин.

Ріст мікробів в цій фазі відбувається в геометричній прогресії. Тривалість генерації в лог-фазі у різних мікроорганізмів не однакова: для сальмонел вона дорівнює 20-30 хв, для стрептококів і стафілококів – 25-35 хв, для ешерихій – 15-17 хв. На тривалість генерацій впливають температура, рН, склад середовища, швидкість обертів мішалки та інші параметри культивування.

3. *Фаза негативного прискорення.* У цій фазі швидкість розмноження сповільнюється, а час між генераціями збільшується. Настання цієї фази обумовлено виснаженням поживного середовища і накопиченням в культуральній рідині токсичних речовин, які починають пригнічувати розвиток культури. Крім того, у цій фазі спостерігається найвища концентрація мікробної маси.
4. *Стаціонарна фаза росту і максимуму,* протягом якої чисельність мікробної популяції не зменшується. У цій фазі швидкість розмноження і відмирання клітин однакова. Концентрація живих клітин в цій фазі досягає максимуму, і вона називається **М-концентрацією**. У цій фазі біомаса мікроорганізмів і продукти їх біосинтезу володіють найбільшою біотехнологічною цінністю.
5. *Фаза відмирання мікробної популяції.* Будь-яка мікробна популяція, яка росте в ємності з незмінюваним середовищем, вступає після фази стаціонарного зростання в стадію відмирання. Тривалість стадії відмирання у різних мікроорганізмів неоднакова: у пневмококу вона становить 2-3 доби, у ешерихій – кілька місяців. У цей період у культурі значно знижується рівень живих клітин, у них зменшується біохімічна і антигенна активність.

Враховуючи все вищенаведене, для виготовлення ряду біопрепаратів відбирають культури мікроорганізмів найчастіше у фазі негативного прискорення зростання або на початку стаціонарної фази, коли концентрація живих мікробних клітин наближається до максимальної.

Способи культивування мікроорганізмів

Культивування є основною стадією технологічного процесу і багато в чому визначає кількісні та якісні характеристики виробництва біопрепаратів. На стадії культивування здійснюється накопичення як самої біомаси, так і продуктів метаболізму (життєдіяльності) мікроорганізмів.

Культивування – це процес вирощування мікроорганізмів в (на) поживному середовищі, в результаті якого відбувається розмноження і накопичення їх біомаси і продуктів метаболізму (продуктів мікробного синтезу).

У тому випадку, коли культура росте на поверхні рідкого поживного середовища, споживаючи субстрати, які містяться в ньому, і виділяючи в це середовище продукти метаболізму, такий спосіб культивування називають **поверхневим**. При твердофазному культивуванні клітини ростуть на поверхні щільного поживного середовища, що містить достатню кількість вологи і поживних речовин.

При **глибинному** способі культивування мікроорганізми розподіляються по всьому об'єкту рідкого ПС, а кисень і поживні речовини надходять до клітин в результаті інтенсивного перемішування. Цей спосіб найбільш широко застосовується в даний час у виробництві більшості препаратів з наступних причин.

1. Дозволяє отримати велику кількість бактеріальної маси за короткий час (в 30-60 разів більше, ніж поверхневим способом). Це пояснюється тим, що бактерії відразу починають інтенсивно розмножуватись, переходячи в логарифмічну фазу.
2. Процес легко керований. При аерації культуральної рідини інтенсивно споживаються вуглецеві і азотисті речовини. Для того щоб процеси росту і розмноження не уповільнювались, потрібно під час культивування додатково вводити ці речовини, особливо вуглеводні (глюкоза). Окрім того, додаткове введення біологічних стимуляторів, посилює інтенсивність розмноження і збільшує концентрацію мікроорганізмів. Даний спосіб дозволяє легко корегувати рН середовища в процесі культивування, що дуже важливо для досягнення максимальної інтенсивності розмноження.
3. При даному способі культивування відзначена максимальна відтворюваність результатів.

При глибинному вирощуванні мікроорганізмів їх культури можуть перебувати в періодичних (закритих) і безперервних (відкритих) системах.

Закритою системою називають таку систему, коли хоча б один з компонентів поживного середовища або ж воно все не може ні надходити в систему, ні залишати її. У такій системі швидкість росту мікроорганізмів повинна після прискорення прагнути до нуля через нестачу субстрату або через загибель мікробних клітин внаслідок накопичення ними продуктів метаболізму. Отже, періодичні культури мікроорганізмів знаходяться в нестійкому стані.

Відкрита (хемостатна) система – це коли поживні компоненти можуть надходити до реактору, в якому вирощується той чи інший мікроорганізм, і видалятися з реактору у вигляді продуктів синтезу мікроорганізмів (антибіотики, вітаміни, ферменти тощо.) або біомаси самих мікроорганізмів. При цьому швидкість надходження поживного середовища до реактору і видалення з нього продуктів синтезу або біомаси можна регулювати в потрібному середовищі для розмноження мікроорганізмів.

Розвиток хемостатного культивування відкрило можливість керувати процесом, контролюючи ріст і поведінку мікроорганізмів, а при необхідності втручатись у цей процес, змінюючи швидкість росту до бажаного рівня шляхом впливу на таку культуру зовнішніми чинниками. Нині зацікавленість до безперервного культивування зростає. Однак незважаючи на переваги хемостатного культивування, в біологічній промисловості при виробництві вакцин вони ще не отримали досить широкого застосування з наступних причин:

- технічні труднощі, в першу чергу пов'язані зі створенням асептичних умов;
- при низькій питомій швидкості біомаси періодичний процес за ефективністю не поступається безперервному і більш вигідний, оскільки його простіше здійснити;
- інтенсивний біосинтез багатьох продуктів метаболізму відбувається при повільному зростанні біомаси, тому в періодичних системах концентрація цільового продукту в культуральній рідині зазвичай вища, ніж в безперервних, що істотно підвищує ефективність стадій виділення і очищення продукту.

Технологічний процес глибинного вирощування мікроорганізмів в апаратах-культиваторах (ферментерах) складається з наступних етапів: відбір штамів мікроорганізмів і робота з ними; приготування посівної мікробної культури;

приготування стерилізація поживних середовищ; підготовка культиватора до посіву; внесення посівного матеріалу в культиватор; вирощування мікроорганізмів для контролю процесу культивування. Крім того, він включає ряд допоміжних операцій: стерилізацію обладнання та комунікацій; приготування піногасників і додаткових розчинів.

Підготовчі операції перед культивуванням мікроорганізмів

Зазвичай виробниче культивування мікроорганізмів при приготуванні вакцин здійснюють у великих обсягах. Тому спочатку з наявного еталонного штаму мікроорганізму, який знаходиться, як правило, в ліофільно висушеному стані в ампулі, роблять посіви в невеликі ємності на скошений в пробірках агар, у флакони ємністю 100 або 200 мл, заповнені наполовину поживним середовищем. Потім з пробірок і флаконів роблять пересівання у великі ємності – бутлі об'ємом 18-20 л.

При хорошому накопиченні мікроорганізмів в 20-літрових бутлях посівну культуру вносять до реактору (культиватору). Необхідна кількість посівної культури для виробничого культивування мікроорганізмів становить від 1 до 10% об'єму поживного середовища. Посівні мікробні культури контролюють на збереження ними типових морфологічних, культуральних, біохімічних, антигенних і імуногенних властивостей і відсутність у них сторонньої мікрофлори.

У промислових умовах поживні середовища зазвичай готують в окремому цеху, що забезпечує потреби всіх основних цехів підприємства. Середовища готують в ємностях, забезпечених механічними мішалками, додаючи в певній послідовності розчинні компоненти. При необхідності окремі компоненти піддають додатковій обробці подрібненню, просіванню, відварюванню, екстрагуванню.

При приготуванні поживних середовищ для глибинного культивування особливу увагу приділяють їх ретельній гомогенізації. Тверді частинки нерозчинних компонентів повинні бути досить дрібними, що забезпечує надійність стерилізації, оскільки великі частки повільніше прогриваються, при цьому підвищується вірогідність збереження в них сторонньої мікрофлори, особливо при безперервній стерилізації.

Приготоване поживне середовище стерилізують в установках безперервної стерилізації і передають у цех культивування, заповнюючи нею попередньо простерилізовані реактори. Зазвичай при невеликих обсягах середовища стерилізацію проводять безпосередньо в культиваторі. Реактор заповнюють на 2/3 його об'єму. Перед початком культивування беруть проби середовища з метою визначення якості стерилізації.

Реактор має сорочку для нагрівання паром і охолодження водою. Усередині є турбінна механічна або електромагнітна мішалка зі швидкістю обертання 150-600 об/хв., пристрій для подачі повітря. На кришці реактора є отвори для подачі додаткових розчинів, внесення посівного матеріалу, відводу відпрацьованого повітря, комірка для Рн-метрії, оглядове вікно, пристрій для взяття проб, внесення піногасників, глюкози та інших поживних речовин, а при необхідності і факторів росту. Сучасні реактори додатково оснащені різними вимірвальними приладами.

Технології культивування мікроорганізмів

Вирощування мікроорганізмів в біореакторі може здійснюватися із застосуванням активної аерації мікробних культур, в стані покою без застосування механічних мішалок (без аерації), у стані анаеробіозу.

Промислове культивування мікроорганізмів із застосуванням активної аерації здійснюють у реакторах об'ємом від 0,01 до 100 м³, як правило, в асептичних умовах. Порожній апарат ретельно миють, перевіряють герметичність, стерилізують гострою парою. Одночасно стерилізують всі комунікації. Після чого в реактор подають простерилізоване і охолоджене до 25-35°C поживне середовище, потім вносять посівний матеріал у кількості 5-10% об'єму поживного середовища та вмикають систему аерації й переміщуючий пристрій. Так, для лістерій і сальмонел швидкість обертання механічної мішалки становить 150-180 об/хв., а культура мікробів аерується підігрітим до 37°C, очищеним, стерильним повітрям з коефіцієнтом подачі 1,5л повітря на 1л середовища за одну хвилину. Коефіцієнт заповнення реактора повинен становити 0,6. Перевищення цієї величини може призвести до значного піноутворення, винесенням її повітрям і порушенню асептичних умов.

Температуру культивування підтримують шляхом подачі охолоджуючої води в сорочку та інші теплообмінні пристрої апарату. Оптимальна температура для різних мікроорганізмів різна, зазвичай від 25 до 37°C.

Для регулювання рН культуральної рідини в ході культивування додають відповідні титри агенти – луги, кислоти, розчин аміаку, глюкози та ін. Тривалість вирощування мікроорганізмів в культиваторі 18-24 год, для спороутворюючих вона коливається від 40 до 250 год (для актиноміцетів і мікроскопічних грибів).

Процес культивування контролюють за змінами температури, рН, витрат повітря, частоти обертання мішалки, вмісту O₂, а також шляхом періодичного відбору проб (через 1-12 год залежно від тривалості процесу). У пробах визначають вміст вуглеводів, загального і аміноазоту, наявність сторонньої мікрофлори, досліджують морфологію мікробних клітин.

Технологія культивування в стані спокою без аерації здійснюється з мікроорганізмами, що відносяться до групи мікроаерофільних (збудники бруцельозу, лептоспірозу, кампілобактеріозу та ін.), які не вимагають примусової аерації поживного середовища, в якому вони вирощуються. Застосовують балонний і реакторний спосіб культивування. Балонний спосіб культивування лептоспір полягає в тому, що мікробні культури кожного їх серологічного варіанту вирощуються в 20-літрових скляних бутлях з 10-12 літрами сироваткового або альбуміно-сироваткового (виробничого) середовища при 27-28°C протягом 5-7 діб. Реакторний спосіб культивування здійснюється в апаратах-культиваторах.

До анаеробних мікроорганізмів відносяться ті, які здатні жити і розмножуватися при відсутності атмосферного кисню. У силу біологічних особливостей анаеробів методи культивування їх у промисловості мають свої особливості. При культивуванні анаеробних мікроорганізмів в реакторах створюються умови повного витіснення з поживного середовища вільного кисню. Це досягається шляхом заповнення анаеробостатів газовою сумішшю водню і діоксиду вуглецю, залишковий кисень видаляється шляхом каталітичного зв'язування з повітрям. Анаеробні умови можуть бути досягнуті також додаванням до середовища відновлюючих агентів таких, як цистину і

сульфіду натрію, аскорбінової кислоти. Ступінь анаеробіозу визначається показником окислювально-відновного потенціалу. При культивуванні анаеробів необхідно постійно коригувати рН середовища, підтримуючи її в межах 7,2-7,8. У процесі вирощування анаеробів рН середовища дуже швидко знижується в кислий бік, що призводить до інгібування їхнього росту.

Культивування вірусів в організмі тварин

Віруси є внутрішньоклітинними мікроорганізмами, тому вони на штучних поживних середовищах не ростуть. Для їх вирощування використовують живі лабораторні моделі: лабораторні або сільськогосподарські тварини, що курячі ембріони, що розвиваються або ембріони інших птахів, а також культуру клітин приготовлену з тканин тварин або людей.

Один із способів культивування вірусів передбачає зараження ними тварин. Зазвичай вибір тварини залежить від виду вірусу. У якості лабораторних моделей використовують білих мишей (іноді новонароджених) і щурів, бажано інбредних ліній, золотих сирійських хом'яків, морських свинок, тхорів, кроликів, собак, курей, голубів, мавп, вівць, телят, лошат, поросят та ін. Найбільш придатними для культивування вірусів є тварини, вільні від специфічних патогенних збудників захворювань, а також тварини-гнотобіоти (стерильні тварини).

Перед зараженням у тварин обробляють місце ін'єкції, після чого з урахуванням тропізму вірусу вводять вірусомісний матеріал оральним, ректальним, інтраназальним, наскірним, внутрішньошкірним, підшкірним, внутрішньом'язовим, внутрішньовенним, внутрішньочеревним способами, а також у мозок, на рогівку ока, в тестикули й іноді іншими методами.

Заражених тримають ізольовано від здорових тварин і за ними ведуть клінічні спостереження. Ознаками зараження тварин є розвиток типових клінічних симптомів захворювання або їх загибель.

При виробництві противірусних препаратів лабораторних тварин використовують для контролю, а також для приготування деяких тканинних вірусних вакцин. Типовим прикладом є виробництво антирабічної фенол-вакцини з мозку вівць, заражених вірусом-фікс сказу, формол-вакцини проти ящуру з вірусів, отриманих після зараження кроленят (лапінізований вірус), деяких вакцин проти віспи, виготовлених з тканин, що містять вірус віспи тощо.

Культивування вірусів у курячих ембріонах

У курячих ембріонах, що розвиваються (КЕР) можуть розвиватись більшість вірусів. Це обумовлено тим, що курячий ембріон містить чотири різних природних поживних субстрати для розмноження вірусів: амніон, аллантаїс, хоріоаллантаїсну мембрану і жовточний мішок, клітини яких, як і клітини самого ембріону, є високочутливими до різних вірусів. Внаслідок цього курячі ембріони придатні для виділення вірусів з патологічного матеріалу, отримання антигенів, визначення титрів інфекційності вірусів, постановки реакції нейтралізації тощо. В силу високої продуктивності та накопичення деяких вірусів КЕР використовують як модель для отримання вакцин проти ряду захворювань тварин і людини.

Для отримання КЕР використовують яйця від білих леггорнів, які мають тонку шкаралупу. Вони повинні бути свіжими (не старше десяти діб). В іншому випадку розвиток зародка, незважаючи на запліднення, сильно затримується.

Яйця повинні бути чистими, але немитими. Інкубацію проводять у звичайних інкубаторах з автоматичною функцією для перевертання яєць, вентилятором, термометром і гігрометром. Роботу проводять при 37,2-38,7°C і вологості 60-70%. Вік КЕР, що використовують для роботи, залежить від вірусу, яким будуть заражати курячі ембріони. Однак незалежно від цього яйцям потрібно провести овоскопію через 3-4 доби, для того щоб прибрати незапліднені яйця (бовтуни) і яйця із загиблими ембріонами. Подальший розвиток ембріонів проводять з дотриманням вищевказаних умов. Зазвичай КЕР заражають у віці 7-11 діб.

Зараження КЕР проводять у стерильному боксі, де є робочі столи, стільці, куди підведені вода, газ, вакуум. Перед початком роботи стіл дезінфікують. Заздалегідь готують необхідні інструменти, асептичний розчин, йодований спирт, зігнутий зубний зонд або бормашину для просвердлювання шкаралупи. Зараження ембріонів проводять за допомогою стерильних спеціальних шприців і голок. Розплавленим парафіном заливають отвори в шкаралупі після зараження. Крім того, необхідна ємність з дезінфікуючою рідиною для використаного інструменту. У боксі повинна бути спеціальна підставка для яєць. Незалежно від патогенності вірусів, що використовуються, робота проводиться в масках, захисних окулярах, гумових рукавичках, у спеціальних костюмах для стерильних приміщень.

Зараження курячих ембріонів проводять заздалегідь підготовленим вірусом в дозуваннях, відтитрованих за LD₅₀. Щоб мати стерильну (без бактерій) суспензію вірусу, отриману з курячого ембріону, до інокулюючого вірусного матеріалу додають по 100-1000 мг стрептоміцину і 100-1000 ЕА пеніциліну.

Способи зараження курячих ембріонів залежать як від виду вірусу, так і від мети зараження. Спосіб культивування вірусів в аллантаїсній порожнині курячих ембріонів в біопромисловості використовується при отриманні антигенів для діагностики грипових інфекцій у людей, коней, птахів, а також для отримання живих та інактивованих вакцин проти грипу у людей, тварин і птахів, псевдочуми птахів зі штаму «Н», інфекційного ларинготрахеїту птахів та ін. У ряді випадків живі вакцини готують з вірусів, вирощених на хоріоаллантаїсній оболонці курячих ембріонів, наприклад, суха ембріон-вакцина з голубиною вірусом проти віспи птахів.

Культивування вірусів на культурах тканин

Значним внеском у розвиток вірусології стало застосування тканинних культур, що істотно просунуло вперед вірусологічні дослідження. Культивування вірусів поза організмом пов'язане з відкриттям можливості вирощування вірусів поліомієліту в екстраневральних тканинах та удосконаленням методу тканинних культур. Цьому у величезній мірі також сприяло відкриття антибіотиків, створення синтетичних і напівсинтетичних поживних середовищ.

Головною перевагою способу культивування вірусів на тканинних клітинах є його відносна дешевизна, а також він може бути використаний для культивування практично всіх відомих вірусів. За допомогою культур клітин можна отримати достатньо «чистий» вірус, з невеликим числом чужорідних антигенів, у вигляді клітинних компонентів, що дуже важливо при приготуванні противірусних вакцин, сироваток і діагностикумів.

Приготування зазначених препаратів вимагає високої чистоти виробництва, створення банків клітинних культур і вірусів. У вірусології найбільш часто використовують наступні культури клітин:

- одношарові (моношар) – це клітини тих чи інших органів або тканин, що ростуть в один шар на поверхні посудини. Слід зауважити, що всі клітинні культури, фіксовані на стінках посудин, у яких вони вирощуються, є одношаровими. Це необхідно враховувати при характеристиці інших клітинних культур та їх ліній;
- первинна – це така культура, для якої використані клітини, органи або тканини, взяті безпосередньо з організму;
- субклітинна культура (субкультура). По суті це лінія, що одержана з первинної культури клітин шляхом переносу з однієї системи (ємності) в іншу, тобто це вторинна культура клітин.

За частотою використання клітинні культури підрозділяються на періодичні та постійні. Перші використовуються в технологічному процесі, як правило, одноразово. Другі є безперервними, постійними клітинними лініями, які в технологічному процесі використовуються багаторазово.

Всі постійні клітинні лінії, на відміну від культур нормальних первинних клітин з обмеженим терміном життя, є трансформованими. Іншими словами, вони змінені за рядом ознак, головною з яких є «безсмертя».

Питання для контролю:

1. Що таке вакцини та які вони бувають?.
2. Назвіть та охарактеризуйте фази росту і розмноження мікроорганізмів.
3. Що таке культивування? Яке воно буває?
4. Які бувають системи культивування?
5. Які бувають технології культивування мікроорганізмів?

Лабораторна робота №8

Виділення і концентрація мікроорганізмів та продуктів їх синтезу

Особливості культуральних рідин після ферментації

У культуральній рідині після закінчення процесу ферментації містяться мікроорганізми, продукти їх життєдіяльності, залишки поживного середовища, піногасник, розчинні і нерозчинні речовини. Цільовим продуктом біосинтезу можуть бути безпосередньо самі мікроорганізми або їх метаболіти, які розчинені в культуральній рідині або містяться всередині клітин мікроорганізмів.

Культуральні рідини зазвичай є складними сумішами і містять велику кількість компонентів, багато з яких є близькими за фізико-хімічними властивостями. Поряд з розчиненими мінеральними солями, вуглеводами, білками і іншими органічними речовинами культуральні рідини містять в значній кількості полідисперсні колоїдні часточки. Отже, вони є не тільки багатокомпонентними розчинами, а й суспензіями. Дисперсна фаза цих суспензій складається з міцелію або клітин мікроорганізмів, а також з твердих частинок, які містяться в багатьох поживних середовищах, – борошна, пластівців з кукурудзяного екстракту тощо.

Вміст мікроорганізмів в культуральній рідині, як правило, дуже низький. В 1 л міститься зазвичай 5-10 г сухої біомаси. Відділення такої кількості зваженої фази – важка технологічна задача, яку доводиться вирішувати шляхом концентрування біомаси різними способами.

Більшість цільових продуктів мікробіологічного синтезу нестабільні і схильні до впливу різних факторів. Білки, наприклад, виключно чутливі до нагрівання, зміни рН середовища, до багатьох фізичних і хімічних впливів. Дуже часто виділити цільовий продукт одним методом практично неможливо, тому застосовують комбінацію декількох методів.

При виборі методу виділення і концентрації того чи іншого продукту мікробіологічного синтезу необхідно враховувати наступні фактори: фізико-хімічні властивості культуральної рідини; властивості продукту, що виділяється (термолабільність, стійкість до різних хімічних агентів та ін.); вимоги до кінцевої форми продукту (ступінь чистоти і концентрування); технологічні і техніко-економічні показники (вихід продукту, продуктивність обладнання, необхідність подальшої обробки та ін.).

Осадження

Осадження (седиментація) – це процес розшарування дисперсних систем під дією сили тяжіння і відділення дисперсної фази у вигляді осаду. Найпростіший випадок седиментації – відстоювання застосовують у наступних випадках:

- 1) при діаметрі часток більше 3 мкм, коли броунівський рух істотно не впливає на процес відстоювання;
- 2) при виділенні стабільних продуктів, коли фактор часу не має вирішального значення;
- 3) при більш низьких, ніж при інших методах, витратах;
- 4) в особливих випадках, коли необхідно розділити частки на фракції за розміром чи щільністю на підставі їх різних швидкостей осадження;

5) якщо необхідно попередньо розділити суспензію на дві фракції – осад і надосадову рідину, які в подальшому можна обробляти на різному устаткуванні.

Швидкість осадження біомаси з культуральної рідини невелика і складає близько 10^{-6} - 10^{-7} м/с. Для прискорення процесу осадження застосовують: **коагулянти** – речовини, що переводять зважені частинки в агрегатно-нестійкий стан (желатин, рибний клей, казеїн); **флокулянти** – речовини, що сприяють руйнуванню колоїдних структур і утворенню великих пластівців (метилцелюлоза, пектин, альгінат натрію).

Центрифугування

Центрифугування – це розподіл неоднорідних систем під впливом поля відцентрових сил. Центрифуги, що мають високий фактор поділу і оснащені тарілчастим барабаном, називають сепараторами. У мікробіологічній промисловості сепаратори є одним з найрозповсюджених типів центрифуг. Вони дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90%.

В останні роки з'явилися спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють вести процес сепарування в автоматизованому режимі, оптимально підбраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин. Області застосування центрифугування:

- 1) виділення біомаси з культуральної рідини (дріжджі, бактерії, гриби);
- 2) відділення різних цільових продуктів мікробіологічного синтезу (антибіотики, ферменти, вітаміни та ін.), Переведених попередньо в тверду фазу;
- 3) поділ емульсій, що утворюються при екстракції.

Головні переваги центрифугування і сепарування - висока продуктивність і високий ступінь концентрування - дозволяють успішно конкурувати з іншими способами виділення і концентрації як у промислових, так і в лабораторних умовах.

Фільтрування

Фільтрування – це поділ твердої і рідкої фаз суспензії при пропущенні її через пористу перегородку. Фільтрування – гідродинамічний процес, швидкість якого прямо пропорційна різниці тисків, що створюються по обидва боки фільтрувальної перегородки, і обернено пропорційна опору, який зазнає рідина при її русі через пори перегородки і шар утвореного осаду.

На процес фільтрування впливає ряд факторів, які можна розділити на дві групи:

- 1) макрофактори – різниця тисків, товщина шару осаду, в'язкість рідкої фази тощо – попередньо відомі і контролюються приладами;
- 2) мікрофактори – розмір і форма частинок осаду і пор фільтрувальної перегородки, товщина подвійного електричного шару на поверхні часточок тощо – менш вивчені і їх характеризують лише непрямими методами. Саме мікрофактори мають вирішальний вплив на процес фільтрування і ускладнюють його масштабування.

При фільтруванні культуральної рідини утворюються здебільшого драглистий пластівчастий або дрібнозернистий осад, що володіє великим опором. Середня швидкість фільтрації при цьому складає всього 50 л/м² за годину. Для збільшення швидкості фільтрування зазвичай використовують два

прийоми: попередня обробка суспензій і застосування допоміжних фільтрувальних матеріалів.

Попередня обробка культуральної рідини дозволяє більш повно перевести цільовий продукт в рідку або тверду фазу, забезпечити кращий поділ фаз і отримати продукт, придатний для подальшого очищення і виділення. У результаті попередньої обробки відбувається коагуляція зважених часток.

Найбільш поширені такі способи попередньої обробки:

- 1) кислотна коагуляція (застосовується для виділення антибіотиків, стійких до низьких рН);
- 2) обробка електролітами;
- 3) теплова коагуляція (можлива в тих випадках, коли продукт стійкий до нагрівання при 70-80°C);
- 4) утворення наповнювачів при додаванні хімічних агентів.

У якості допоміжних фільтрувальних матеріалів використовуються фільтрувальні порошки, які вносять у фільтровану рідину як наповнювачі або попередньо наносять на робочу поверхню фільтра у вигляді ґрунтового шару.

Екстракція

Екстракція – процес розділення суміші твердих і рідких речовин за допомогою селективних розчинників. Фізична сутність екстракції полягає в переході компонента, який виділяється, з однієї фази (рідкої або твердої) в фазу рідкого екстрагента при їх взаємному зіткненні. Екстрагуючі компоненти переходять з вихідного розчину в розчинник внаслідок різниці концентрацій, тому даний процес відноситься до числа дифузних.

Процес екстракції проводиться зазвичай у двофазних системах: тверде тіло – рідина або рідина – рідина. Область застосування екстракції: виділення і очистка антибіотиків, вітамінів і амінокислот.

Іонообмін (адсорбція)

Іонний обмін являє собою сорбційний процес. **Адсорбція** – це процес поглинання одного або декількох компонентів цільового продукту з газової суміші або розчину твердою речовиною – адсорбентом.

Процеси адсорбції (як і інші процеси масопередачі) вибіркові і зазвичай оборотні. Завдяки цьому стає можливим виділення поглинутих речовин з адсорбенту, тобто проведення процесу **десорбції**.

Перші сорбційні методи виділення і очищення біологічно активних речовин та антибіотиків були засновані на застосуванні молекулярних сорбентів (активоване вугілля, оксид алюмінію та ін.). Молекулярні сорбенти однаково добре сорбують як цільові речовини, так і ряд домішок.

Нині розроблені іонообмінні сорбенти (іоніти), які характеризуються різною вибірковістю і високою специфічністю.

Іоніти – це органічні та неорганічні речовини, практично нерозчинні у воді і звичайних розчинниках, які містять активні (іоногенні) групи з рухомими іонами, які здатні обмінювати ці іони на іони електролітів при контакті з їх розчинами.

Залежно від наявності іоногенних груп іоніти можна розділити на два основні класи: **катіоніти** – іонообмінні сорбенти, що містять кислотні групи (нерозчинні кислоти) і **аніоніти** – іонообмінні сорбенти, які містять основні групи (нерозчинні основи).

Іоніти знайшли широке застосування в технології виробництва антибіотиків на етапі їх сорбції з культуральної рідини.

Кристалізація

Кристалізація – це виділення твердої фази у вигляді кристалів головним чином з розчинів і розплавів. Кристалізація заснована на різкому зменшенні їхньої розчинності в результаті зміни температури розчину або переведення їх в іншу погано розчинну хімічну форму. Останнє досягається зміною рН розчину або додаванням відповідного реагенту, часто з одночасним зниженням температури.

Кристалізація є не тільки способом отримання цільових речовин у твердому вигляді, але і дуже ефективним засобом очищення від супутніх домішок, що є суттєвою перевагою в порівнянні з деякими іншими методами поділу.

Метод кристалізації знайшов застосування в технології отримання антибіотиків (тетрацикліну, еритроміцину та ін.), вітамінів, поліцукрів.

Випарювання

Випарювання – це процес концентрування рідких розчинів шляхом часткового видалення розчинника випаровуванням при нагріванні рідини. У ряді випадків випарений розчин піддають кристалізації.

Концентровані розчини та тверді речовини, одержувані в результаті випарювання, легше і дешевше переробляти, зберігати і транспортувати.

Зазвичай випарювання у виробництві антибіотиків здійснюють при 60-70°C під вакуумом, тому даний метод неефективний при переробці термолабільних біологічно активних речовин.

Мембранні методи розділення

До мембранних методів поділу відносяться діаліз і електродіаліз; зворотний осмос; мікрофільтрація; ультрафільтрація. В основі цих методів лежить явище **осмосу** – дифузія розчинених речовин через напівпроникну перегородку, що представляє собою мембрану з великою кількістю (до 10^{10} - 10^{12} на 1 м^2) дрібних отворів – пор, діаметр яких не перевищує 0,5 мкм.

Під мембраною прийнято розуміти високопористу або безпористу пласку або трубчасту перегородку, виготовлену з полімерних або неорганічних матеріалів і здатну ефективно розділяти частинки різних видів (іони, молекули, макромолекули і колоїдні частинки), що знаходяться в суміші або розчині.

Мембранні методи розділення біологічних суспензій мають ряд переваг:

- 1) концентрування та очищення здійснюються без зміни агрегатного стану і фазових перетворень;
- 2) продукт, що переробляється, не піддається тепловим і хімічним впливам;
- 3) механічний та аеродинамічний вплив на біологічний матеріал незначний;
- 4) легко забезпечуються герметичність і асептичні умови;
- 5) апаратурне оформлення компактне за конструкцією, відсутні рухомі деталі;
- 6) процес не володіє високою енергоємністю, в більшості випадків енергія витрачається тільки на перекачування розчинів.

Питання для контролю:

1. Які особливості культуральних рідин після ферментації?

2. Що таке осадження, при яких умовах воно використовується?
3. Що таке центрифугування, при яких умовах воно використовується?
4. Що таке фільтрування, при яких умовах воно використовується?
5. Що таке екстракція, при яких умовах вона використовується?
6. Що таке іонний обмін, його види та при яких умовах він використовується?
7. Що таке кристалізація, при яких умовах вона використовується?
8. Що таке випарювання, при яких умовах воно використовується?
9. Які мембранні методи розділення вам відомі та умови їх використання?

Лабораторна робота №9

Висушування мікроорганізмів і продуктів їх синтезу

Стабілізація біологічних матеріалів **висушуванням**

Відомо, що в звичайних умовах тривалість збереження більшості біологічних продуктів обчислюється кількома днями. У зв'язку з цим розроблялися різні способи консервування біологічних препаратів, які нині можна розділити на:

- консервування при позитивних температурах за допомогою хімічних сполук (хлороформ, фенол, гліцерин, формалін тощо);
- консервування при низьких температурах (заморожування);
- консервування висушуванням.

Необхідно відзначити, що зневоднення – важкий технологічний процес, який часто є вирішальним етапом виробництва, що впливає на якість продукції, що випускається.

Висушування є одним з найбільш досконалих процесів стабілізації властивостей продуктів біологічного походження і дозволяє зберігати ці продукти в звичайних умовах тривалий час. Крім того, істотно зменшена маса дозволяє значно знизити транспортні витрати і витрати на тару. Перевагою штучного висушування є значно менші витрати часу на видалення вологи. Процес сушіння – це різноманітний комплекс теплових, дифузних, часто біологічних і хімічних явищ (особливо, у випадку інтенсивної сушки).

Препарати біологічного походження звичайно являють собою складні об'єкти сушіння, що характеризуються рядом показників, найважливішими з яких є початкова, кінцева і рівноважна вологість, термічні, електрофізичні, структурно-механічні та масообмінні характеристики. Різноманітність властивостей продуктів вимагає індивідуального підходу до розробки раціональних методів їх сушіння (з урахуванням вимог до якості готового виробу).

Виходячи з властивостей матеріалів біологічного походження необхідно вибирати оптимальні режими висушування з урахуванням допустимої температури нагріву матеріалу, тобто температури, при якій висушений продукт зберігає стандартні якості і володіє найкращими технологічними властивостями. Основними характеристиками термолабільних матеріалів біологічного походження як об'єктів сушіння є:

- **термостійкість** – здатність матеріалу протистояти нагріванню до температури, при якій відбувається необоротні зміни його якості (руйнування фізичної або хімічної структури);
- **термостабільність** – здатність матеріалу тривалий час витримувати нагрівання при певній температурі без зміни властивостей продукту (без його розкладання).

Матеріали нетермостійкі і нетермостабільні в цілому називають **термолабільними**. Різна природа об'єктів сушки зумовила вибір діапазонів температур та експозицій нагріву з урахуванням максимального збереження числа життєздатних мікроорганізмів і біологічної активності продуктів.

Ліофільне висушування

Одним з основних методів консервування біопрепаратів, що дозволяє тривалий час зберігати їх активність, є метод ліофільного висушування. Він

дозволяє зберегти практично без зміни первинні властивості живих і рідше інактивованих вакцин, діагностичних і лікувальних сироваток, антигенів та інших біологічно активних препаратів, що використовуються для профілактики, діагностики та лікування.

Ліофільне висушування складається з двох прийомів консервування – заморожування і висушування. Вологу із заморожених препаратів видаляють з використанням глибокого вакууму, минаючи рідку фазу. В результаті вдається максимально зберегти специфічні властивості білків, звести до мінімуму їх денатурацію, забезпечити живим клітинам і вірусам стан тривалого анабіозу, що дозволяє отримати стандартизовані за активністю біопрепарати.

Консервування біопрепаратів методом ліофільного висушування має ряд переваг перед іншими методами: знижується маса біопрепарату; тривалий час зберігається вихідна активність (вакцин – до 12-18 міс, сироваток – до 2-3 років); припиняється ріст мікробних контамінантів; висушені препарати можна зберігати при 4-8°C, допускається короткочасне підвищення температури до 10-15°C (на період транспортування до 7 днів).

Технологічний процес ліофілізації включає ряд етапів:

1. Підготовка матеріалу для сушіння і вибір відповідного кріопротектора (компонентів середовища висушування).
2. Підготовка апарату для висушування.
3. Попереднє охолодження препарату, який підлягає сушінню, після розфасовки в ампули або флакони. Визначення евтектичних температур.
4. Сублімація і досушування препарату при підігріві. Заморожування і висушування здійснюються за встановленими режимами.
5. Вакуумна або звичайна закупорка після сушіння, тобто створення умов для тривалого зберігання сухих препаратів.
6. Визначення активності, стерильності, залишкової вологості та інші показники згідно з технічними умовами.

При заморожуванні біопрепаратів змінюються осмотичний тиск і концентрація водневих іонів, що може призвести до пошкодження клітинних біомембран. Речовини, що знижують або запобігають ці ушкодження, були названі **кріопротектори** і спочатку використовувалися для тривалого зберігання музейних штамів мікроорганізмів.

Через різноманіття кріозахисних речовин їх класифікують по відношенню до мембранного апарату клітини на проникаючі всередину клітини – **ендоцелюлярні** і непроникаючі – **екзоцелюлярні**. Останні адсорбуються на зовнішній оболонці клітини і знижують її проникність для води і біологічно активних речовин, уповільнюють процеси утворення внутрішньоклітинної криги, захищають мембрани від механічних пошкоджень зростаючими кристалами криги.

Вимоги, що пред'являються до захисних середовищ, які використовують при ліофілізації вакцин: атоксичність; відсутність антигенних властивостей; ад'ювантна дія; компоненти середовища повинні служити структуруючим (опорним) матеріалом; середовище повинне поглинати гідролітичні ферменти біоматеріалу і володіти антиокислюваною активністю.

Практично всім цим вимогам відповідають такі речовини: лактоза, цукроза, манітол, сорбітол, пептон, білкові гідролізати, декетран желатину, полівінілпіромідон, глутамат натрію, амінокислоти, тіосечовина та інші сполуки. Велике значення для підвищення захисних властивостей середовища має

додавання катіонів магнію і кальцію, які надають стабілізуючий ефект на мембранний апарат клітини.

Середня швидкість заморожування біопрепаратів перед сушінням складає 0,5-1°C в хвилину. Повне заморожування відбувається при температурі -32...-39°C. Матеріал заморожують безпосередньо в камері або в спеціальних заморожувачах, звідки його переносять в камеру ліофільної сушки і висушують за розробленим в експериментальних умовах графіком.

Після розміщення в камері касет з матеріалом, який підлягає сушінню, її герметично закривають, відповідно з графіком доводять температуру до необхідної і витримують 3-6 год, створюють вакуум і починають підігрівати полки або подавати тепло зі швидкістю 0,5-1,5°C за годину. З цього часу починається сублімаційна сушка, тобто видалення пари вологи із замороженого матеріалу за допомогою вакууму. Вакуум досягає 5-6 Па, або 0,036-0,046 мм рт. ст.

Власне сублімацію умовно поділяють на два етапи: сушка при мінусовій температурі при підвищенні температури на 1-2°C за годину; сушка при плюсовій температурі. Іноді ці етапи називають періодом видалення з матеріалу вільної вологи і періодом видалення зв'язаної вологи.

Сухий матеріал в ампулах запаюють під вакуумом, у флаконах – герметично закупорюють, попередньо заповнивши їх інертним газом (аргон, неон, азот).

Якість висушеного біоматеріалу оцінюють за зовнішнім виглядом, наявністю вакууму, величині залишкової вологості, біологічної активності та іншими показниками згідно з нормативно-технічною документацією.

Конвекційний метод висушування

Конвекційний метод висушування є найпоширенішим в біологічній промисловості. Як сушильний агент застосовують нагріте повітря, топкові гази або перегрітий пар. Сушильний агент передає теплоту матеріалу, під дією якого з матеріалу видалається волога у вигляді пари в навколишнє середовище. Таким чином, сушильний агент при конвекційному сушінні є теплоносієм і вологопоглиначем.

Конвективний метод знайшов застосування в камерних сушильних установках. У таких апаратах сушка матеріалу проводиться періодично під атмосферним тиском. Сушарки мають одну або декілька камер, у яких біоматеріал сушиться в нерухомому стані. Потік нагрітого повітря проходить уздовж продукту і випаровує з нього вологу. Камерними сушильними установками безперервної дії є тунельні сушарки, що працюють під атмосферним тиском. Камери представляють собою довгий герметично закритий тунель, в якому біоматеріал переміщається по або проти току сушильного агента, на кюветах або по стрічці транспортера.

У сушильній практиці також використовують барабанні сушильні установки, які представляють собою порожнистий циліндр з внутрішньою насадкою для безперервного пересипання і перемішування матеріалу, до якого подається теплоносій.

З'являються апарати, що дозволяють досягти стійкої гідродинаміки: сушарки з віброкиплячим шаром, сушарки з шаром інертної насадки, які працюють у шарах, які «киплять» і «фонтанують».

Принцип даного методу полягає в тому, що рідкий, гранульований або пилоподібний продукт повітряним потоком спускається і переходить у зважений стан. Необхідний для цього повітряний потік створюється вентилятором. Всмоктуване зовні або з робочого приміщення повітря подається спочатку в повітряний нагрівач, де підігрівається до необхідної температури. Одночасно відбувається фільтрування повітря від сторонніх часточок, потім потік гарячого повітря проходить знизу вгору через матеріал в ємності і достатньо швидко відбирає з нього вологу. Дно ємності являє собою перфоровану поверхню, яка покрита металевою сіткою з нержавіючої сталі з найтоншими отворами. Готовий продукт вловлюється циклонами і потрапляє в збірники. Розташований над ємністю фільтр запобігає винесенню потоком повітря часточок навіть найтоншого помолу.

Широке впровадження методу сушки у зваженому шарі обумовлено наступними основними перевагами:

- висока інтенсивність процесів переносу, що досягається за рахунок розвиненої питомої та сумарної поверхонь тепло- і масообміну при безперервному оновленні активної поверхні фазового контакту і високих значень коефіцієнта ефективної теплопровідності і тепловіддачі;
- ізотермічності системи, яка досягається внаслідок інтенсивного перемішування твердої фази, що запобігає локальному перегріву часточок;
- порівняно просте конструктивне оформлення апаратів і можливість регулювання режиму їх роботи;
- можливість створення багатоступеневих апаратів, що дозволяє підвищити рушійну силу процесу, поліпшити рівномірність сушіння при автономному регулюванні температурного режиму в окремих ступенях апарату (це особливо важливо при сушінні термолабільних матеріалів).

До основних недоліків киплячого шару слід віднести необхідність обмеження швидкості сушильного агенту величиною швидкості виносу матеріалу, складність обробки полідисперсних речовин, механічне порушення цілісності частинок (стирання, злипання).

Терморадіаційний метод сушки

Суть терморадіаційного методу сушки полягає в тому, що теплота матеріалу передається за рахунок невидимих теплових (інфрачервоних) променів. Інфрачервоні промені (ІЧП) – це промені з довжиною хвилі 0,77-340 мкм.

Для інтенсифікації терморадіаційного сушіння необхідно, щоб ІЧП проникали в матеріал на значну глибину, що залежить як від матеріалу, так і від довжини хвилі ІЧП. Чим менше довжина хвилі, тим більша проникаюча здатність інфрачервоних променів. Проникність матеріалів залежить, в основному, від товщини шару і вологості продукту.

Для матеріалів, у яких розмір часток більше глибини проникнення інфрачервоних променів, рекомендується переривчасте опромінення. У період припинення подачі ІЧП температура на поверхні часточок матеріалу падає внаслідок інтенсивного випаровування, температура всередині часточки більше, ніж на поверхні, і волога починає переміщатися з центральних шарів до поверхневих під дією обох градієнтів: температури і вмісту вологи.

За характером випромінювачів ІЧП розрізняють терморадіаційні сушарки з електричним і газовим обігрівом. Сушарки з електричним обігрівом компактні,

прості в експлуатації, безінерційні. Однак висока витрата електроенергії і нерівномірність сушіння обмежують їх застосування.

Питання для контролю:

1. *В чому полягає необхідність сабілізації біологічних матеріалів?*
2. *Що таке ліофільне висушування, за яких умов воно здійснюється?*
3. *Етапи ліофілізації?*
4. *Що таке кріопротектори, та які вони бувають?*
5. *Охарактеризуйте конвекційний метод висушування.*
6. *В чому переваги конвекційний метод висушування?*
7. *Суть терморадіаційного методу сушки.*
8. *Переваги та недоліки терморадіаційного методу сушки?*

Лабораторна робота № 10

Очищення стічних вод

Біологічне очищення стічних вод – добре освоєний процес. Однак цей процес у його теперішньому стані дозволяє руйнувати тільки відносно прості органічні й амонійні сполуки. Неорганічні сполуки, токсини, комплексні сполуки і складні органічні сполуки (які також можуть бути токсичними) зв'язуються з біомасою, частково руйнуються, але ступінь очищення від них набагато нижче. Наприклад, використання очищення за допомогою активного мулу не гарантує видалення іонів важких металів (кадмій, хром, нікель, свинець, ртуть). Хоча концентрація таких неконтрольованих забруднень у комунальних стоках повинна бути обмежена, вони усе ще являють загрозу для навколишнього середовища при їхньому проскакуванні у вихідний стік. Якщо ж вони сорбуються в активному мулі, то при внесенні цього мулу в ґрунт можуть виникати серйозні проблеми.

Процес очищення стічних вод може здійснюватися за допомогою звичайних очисних споруджень (аеротенк, біофільтр), штучно іммобілізованої біомаси за допомогою іммобілізованих ферментів. Успіхи в створенні і використанні нових видів біомаси і ферментів допоможуть вирішити багато складних проблем.

Біохімічні процеси, що протікають в аеротенку, можуть бути розділені на два етапи:

- адсорбція поверхнею активного мулу органічних речовин і мінералізація легко окислюваних речовин при інтенсивному споживанні кисню;
- доокислення органічних речовин, які повільно окисляються, регенерація активного мулу. На цьому етапі кисень витрачається повільніше.

Як правило, аеротенк розділений на дві частини: регенератор (25% від загального обсягу) і власне аеротенк, у якому йде основний процес очищення.

Наявність регенератора дає можливість очищати більш концентровані стічні води і збільшити продуктивність агрегату.

Аеротенки підрозділяються за наступними основними ознакам:

- 1) за гідродинамічним режимом – на аеротенки-витискувачі, аеротенки-змішувачі й аеротенки проміжного типу (з розосередженою подачею стічних вод);
 - 2) за способом регенерації активного мулу – на аеротенки з окремою регенерацією й аеротенки без окремої регенерації;
 - 3) за навантаженням на активний мул – на високонавантажні (для неповного очищення), звичайні, і низьконавантажні (із продовженою аерацією);
 - 4) за кількістю ступенів – на одно-, дво-, і багатоступінчасті;
 - 5) за режимом введення стічних вод – на проточні, напівпроточні, з перемінним робочим рівнем, і контактні;
 - 6) за конструктивними ознаками.
- Відомі такі конструкції аеротенків:

- Коридорний - працює за принципом витіснення, малоінтенсивний, відкритий;
- Системи Кессенера - поверхневий аератор з обмеженої глибиною, відкритий;
- Системи «Симплекс» - турбінний аератор, відкритий;
- Пневматичний з керамічними повітророзподільниками - інтенсивна аерація за допомогою компресора, відкритий;
- Колонний, баштовий або ерліфтний низька турбидізація середовища (вимагається компресор), закритий;
- Інжекційний з рециркуляцією мулу і спалюванням органічних речовин, що містяться у відпрацьованому газі - інтенсивна аерація (вимагається компресор), закритий.

Найбільш поширені коридорні аеротенки, що працюють як витискувачі, змішувачі, і з комбінованими режимами.

Інша область, у якій успіхи біотехнології будуть сприяти поліпшенню очищення стічних вод, – це видалення важких металів. Звичайно іони важких металів видаляють з розчинів адсорбцією на полісахаридах. Однак сучасний рівень розвитку знань у цій області не дозволяє оптимізувати процес видалення іонів металів та керувати цим процесом у звичайних системах біоочистки стічних вод.

Біохімічні методи очищення стічних вод

Біохімічний метод застосовують для очищення господарсько-побутових і промислових стічних вод від багатьох розчинених органічних і деяких неорганічних речовин (фенолу, сірководню, сульфідів, аміаку, нітритів і нітратів). Процес очищення заснований на здатності мікроорганізмів використовувати ці речовини для свого харчування в процесі життєдіяльності - органічні речовини для мікроорганізмів є джерелом вуглецю й інших елементів.

Основні показники якості стічних вод.

Біологічне споживання кисню (БСК) - кількість кисню, витрачена на аеробне біохімічне окислення під дією мікроорганізмів і розкладання нестійких органічних сполук, що містяться в досліджуваній воді.

БСК є одним з найважливіших критеріїв рівня забруднення водою органічними речовинами, він визначає кількість легкоокислювальних органічних забруднюючих речовин у воді.

При аналізі визначається кількість кисню, що пішла за встановлений час (зазвичай 5 діб - БСК₅) без доступу світла при 20°C на окислення забруднюючих речовин, що містяться в одиниці об'єму води. Обчислюється різниця між концентраціями розчиненого кисню в пробі води безпосередньо після відбору і після інкубації проби.

Як правило, протягом 5 діб за нормальних умов відбувається окислення ~ 70% легкоокислювальних органічних речовин. Практично повне окислення (БСК_{полн.} або БСК₂₀) досягається протягом 20 діб. При вимірюванні БСК особливе значення має кількість і якість мікрофлори.

Оптимальним є використання мікрофлори з уже працюючих біологічних систем, адаптованих до даного спектру забруднень. Причому кількість мікрофлори, що вноситься, повинна відповідати її концентрації в працюючих очисних спорудах.

ХСК – хімічне споживання кисню. ХСК також виражають у мг O₂ на 1 мг речовини.

Контактуючи з органічними речовинами, мікроорганізми частково руйнують їх, перетворюючи у воду, диоксид вуглецю, нітрит- і сульфат-іони й ін. Інша частина речовини йде на утворення біомаси. Руйнування органічних речовин називають біохімічним окислюванням. Певні органічні речовини здатні легко окислюватися, деякі окислюються дуже повільно, або зовсім не окислюються.

Для визначення можливості подачі промислових стічних вод на біохімічні очисні спорудження встановлюють максимальні концентрації токсичних речовин, що не впливають на процеси біохімічного окислювання (МКБ) і на роботу очисних споруджень (МКБ.ос.). При відсутності таких даних можливість біохімічного окислювання встановлюють по відношенню БСКповн. і ХСК.

При відношенні (БСК/ХСК) 100÷50% речовини піддаються біохімічному окислюванню. При цьому необхідно, щоб стічні води не містили отруйних речовин і домішок солей важких металів.

Для неорганічних речовин, що практично не піддаються окислюванню, також встановлюють максимальні концентрації. Якщо такі концентрації перевищені, воду не можна піддавати біохімічному очищенню. Наприклад, МКБ у мг/л для: міді - 0,5; ртуті - 0,02; свинцю - 0,1; хлору - 0,3; бору - 0,05; сірководню - 1; хлориду заліза - 5.

Відомі аеробні й анаеробні методи біохімічного очищення стічних вод.

Аеробний метод заснований на використанні аеробних груп організмів, для життєдіяльності яких необхідний постійний приплив кисню і температура 20...40°C. При зміні кисневого і температурного режиму склад і число мікроорганізмів міняються.

Очищення стічних вод в аеробних умовах проводиться за допомогою біофільтрів або шляхом культивування мікроорганізмів в активному мулі, біоценоз якого складається з різних груп живих організмів (бактерій, черв'яків, грибів, водоростей, рачків). Активний мул є амфотерним колоїдом, у якому показник рН 4...9, а до складу його сухої речовини входить 70...90% органічних і 10–30 % неорганічних речовин. Живі організми разом з твердим носієм, до якого вони прикріплені, утворюють зооглею (*лат. zoogloea, от др.-греч. ζῷον — «животное» и ὑλοῖός — «липкое вещество»*) — слиз, що утворюється при життєдіяльності бактерій) - симбіоз популяцій організмів, вкритий загальною слизовою оболонкою. Співвідношення капсульних і безкапсульних форм клітин в мулі називається коефіцієнтом зооглейності оскільки мікроорганізми, виділені з активного мулу, відносяться до різних родів: *Actinomyces, Arthrobacter, Bacillus, Bacterium, Corynebacterium, Micrococcus, Pseudomonas, Sarcina* та ін. Найбільш численні псевдомонади. Ці мікроорганізми окислюють спирти, жирні кислоти, парафіні, ароматичні вуглеводні, вуглеводи та ін. Мікроорганізми роду *Bacterium* здійснюють деградацію нафти, парафінів, нафтенів, фенолів, альдегідів, жирних кислот. Аліфатичні вуглеводні окислюються представниками роду *Bacillus*. Суттєва роль у створенні та функціонуванні консорціуму клітин належить найпростішим: саркодовим, джгутиковим інфузоріям, війчастим інфузоріям і інфузоріям, що смокчуть.

В активних мулах високої якості на 1 млн бактеріальних клітин має бути 10...15 найпростіших організмів. Це співвідношення називається коефіцієнтом протозойності Кр. Швидкість біохімічного окислення зростає із збільшенням значення коефіцієнтів зооглейності і протозойності.

Основною метою аеробних методів очищення є окисна мінералізація вуглецевмісних органічних сполук і перетворення відновлених форм нітрогену в окиснені (нітрифікація нітрогену з утворенням нітрит- і нітрат-іонів).

Аеробне біохімічне очищення стічних вод від органічних сполук здійснюється за участю гетеротрофних мікроорганізмів, для яких джерелом живлення є органічний вуглець (білки, жири, вуглеводи та ін.). Поживна цінність вуглецю проявляється по-різному і залежить як від фізико-хімічних властивостей вищезначених органічних речовин стічних вод, так і від фізіологічних особливостей мікроорганізмів. У процесі життєдіяльності мікробів частина атомів вуглецю окислюється спочатку до карбонових кислот ($-COOH$), а потім до вуглекислого газу. Частина атомів вуглецю відновлюється до радикалів $CH_3 - CH = CH-$, що входять у склад клітини.

Біохімічне руйнування органічних речовин відбувається завдяки перебігу послідовних реакцій, під час яких первинна структура речовини поступово спрощується. Наприклад, при окисленні вуглеводів, жирів і деяких амінокислот, хоча й різними шляхами, утворюється однакова сполука – так званий "універсальний метаболіт" – ацетил-КоА, продуктами повного окиснення якого надалі є діоксид вуглецю й вода. Таким чином, механізм очищення стічних вод пов'язаний із перетворенням наявних там компонентів в екологічно безпечні метаболічні сполуки. Енергетичний обмін в організмах бактерій, що вимірюється інтенсивністю споживання кисню, значно перевищує обмін у клітинах вищих тварин і рослин. Бактерії легше за інші організми адаптуються до споживання нових органічних субстратів. Крім того, мікроорганізми відрізняються від макроорганізмів високою пристосованістю до умов навколишнього середовища.

Аеробні методи прийнято також розподіляти типом резервуара, у якому проходить окиснення речовин-забруднювачів. Резервуарами можуть бути біоінженерні споруди (БІС) у вигляді біологічних ставків – (так званих біоплато, полів фільтрації), а також використовують спеціальні апарати – біофільтри й аеротенки.

Анаеробні методи очищення протікають без доступу кисню; їх використовують, головним чином, для знешкодження осадів. З цією метою використовують **метанове бродіння**. Перевага такого методу – високий рівень перетворення речовин-забруднювачів з утворенням додаткового продукту – біогазу. Анаеробний процес розкладання основних органічних домішок у стічних водах (жирів, білків і вуглеводів) можна уявити у вигляді принципової схеми (рис. 4).

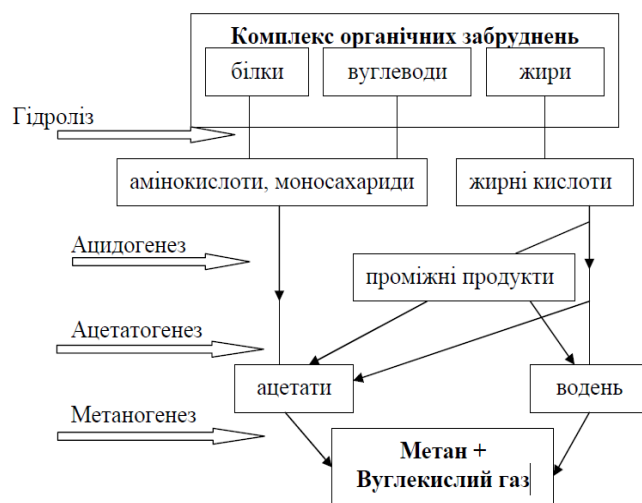


Рис. 4. Схема анаеробного розкладання органічних речовин у стічних водах

Метанове бродіння дешевих органічних целюлозовмісних матеріалів дозволяє виробляти повноцінне альтернативне біологічне паливо (біогаз).

Очищення промислових і побутових стічних вод – це досить актуальна екологічна проблема. Тому з метою її вирішення на практиці використовуються багатоступеневі процеси аеробного та анаеробного біохімічного окиснення забруднюючих речовин у стічних водах (рис. 5).

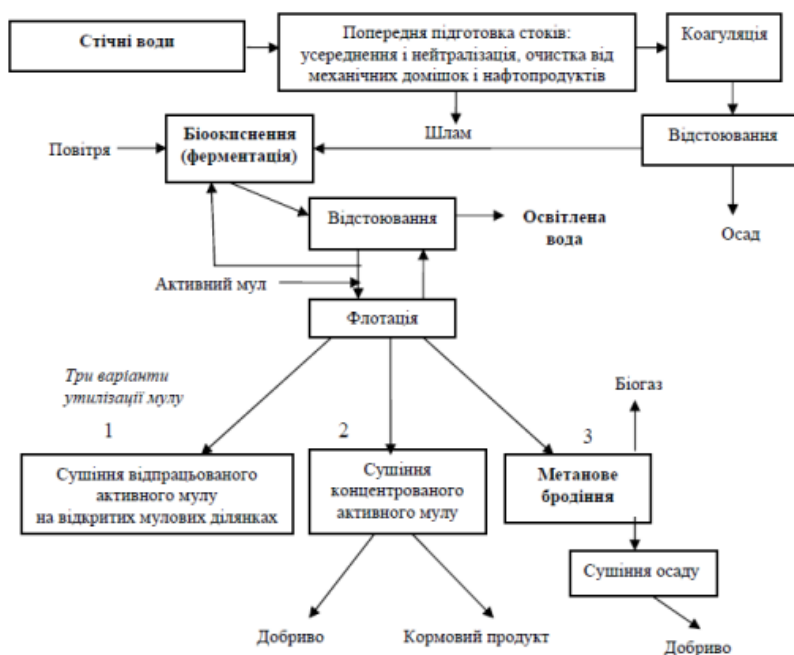


Рис. 5. Блок-схема біотехнологічного очищення стічних вод

Як показує схема, підготовлені стоки проходять стадію біоокиснення, де відбувається сорбція та перетворення органічних речовин ферментним комплексом активного мулу. Це аеробний процес, який відбувається в біореакторах-аеротенках, куди подається повітря. Далі мулові маси відділяються від рідини відстоюванням, а очищена вода надходить у

водоймище. Згущений активний мул частково повертається на стадію біоокиснення, а його надлишок утилізується одним з трьох зображених на схемі способів.

Питання для контролю:

1. Етапи біохімічних процесів очищення стічних вод?
2. Класифікація аеротенків для очистки стічних вод?
3. Біохімічні методи очищення стічних вод)
4. Назвіть основні показники якості стічних вод.
5. Суть аеробного методу очистки стічних вод.
6. Суть анаеробного методу очистки стічних вод.

Лабораторна робота № 11

Утилізація органічних відходів

Біологічні методи переробки органічних відходів є найбільш екологічно безпечними. Їх використання не супроводжується утворенням нових токсичних речовин та забрудненням довкілля шкідливими сполуками. Тому очевидно, що найбільш оптимальним є поєднання сортування та біологічних методів переробки відходів.

Сьогодні найбільш поширеними біологічними методами знешкодження органічних відходів є *компостування* та *вермікультивування*. При відповідній організації технологічного процесу кінцевий продукт біологічних методів знешкодження органічних відходів – гумус (біогумус), придатний для використання у сільському господарстві, садівництві, ландшафтному будівництві. У 70-80 рр. минулого століття приймалися спроби використання компостування для отримання енергії шляхом прокладання в буртах відходів спеціальних теплообмінників, по котрих прокачувалася вода чи продувалося повітря. В окремих випадках в незначних кількостях компост може використовуватись в якості харчової добавки для тварин. Фактично біологічні процеси, що використовуються для знешкодження органічних відходів, постійно проходять в живій природі. Роль людини в їх використанні – адаптація процесів до відповідних умов та контроль протікання біологічної переробки відходів у необхідному напрямку.

Компостування – процес розкладання органічних компонентів відходів мікроорганізмами в присутності кисню повітря з утворенням вуглекислого газу, води, тепла та компосту. Основною сировиною дія мікроорганізмів служать високомолекулярні та олігомерні природні речовини. Відповідно до умов, компостування поділяють на аеробне (в присутності окислювачів) та анаеробне (без доступу повітря). Останній тип компостування передбачає переробку відходів в тілі звалища чи у спеціальних герметичних метантенках, котрі частіше використовуються для знешкодження твердих відходів сільського господарства та відсортованої органічної складової ТПБВ. Аеробне компостування поділяють на *дворове (місцеве)* та *централізоване*. В свою чергу централізоване компостування поділяють на *компостування у валках* та

тунельне компостування.

Компостування найбільш придатне для знешкодження відходів сільського господарства, харчової фракції органічних відходів, деревини, листя, обпилювань і т.п. В результаті компостування таких відходів отримують якісний гумус, придатний до використання в якості добрива у сільському господарстві. Відповідно, такий гумус не справляє негативного впливу на докільля і може без застережень використовуватись у людській діяльності. Основними умовами використання компостування для утилізації органічних відходів є наявність в них не менше 25 % органічних компонентів, здатних легко утилізуватися живими організмами та наявність споживачів отримуваної продукції. При компостуванні термін знешкодження органічних відходів триває 4-18 місяців замість 50-100 років при їх захороненні на полігонах.

Дворове компостування передбачає проведення процесу переробки органічної складової ТПБВ, харчових та зелених відходів окремими домовласниками на своєму подвір'ї. Для *централізованого компостування органічних відходів у валках* вибирають рівну ділянку території, яка не затоплюється талими та дощовими водами, а максимальний рівень ґрунтових вод розміщується на глибині не менше 1 м від поверхні, на якій розміщуються відходи. Основними лімітуючими факторами компостування є чисельність мікробної популяції та умови в навколишньому середовищі. В окремих випадках до компосту для регулювання додають азотовмісні речовини. При компостуванні у валках виділяють кілька рівнів:

- **мінімальний рівень** – влаштовують штабелі 6 м у ширину та довжину при висоті 4 м. Перелопачування компосту проводять 1 раз/рік і через 1-3 роки отримують готовий компост;
- **низький рівень** – влаштовують штабелі 3-4 м у ширину та довжину при висоті 2 м. Перелопачування компосту проводять через 1 та через 10-11 місяців після початку компостування і через 16-18 місяців отримують готовий компост; **середній рівень** – штабелі наведених вище розмірів перелопачують щоденно. Тривалість приготування компосту – 4-6 місяців;
- **високий рівень** – використання спеціальної аерації компостних штабелів. Тривалість приготування компосту – 2-10 тижнів.

Сьогодні виробляється достатня кількість спеціалізованого обладнання, призначеного для механізації компостування відходів. Так, зацікавленість фахівців може викликати просіююча ковшова дробарка серії АПШ.

Питання для контролю:

1. Що таке компостування?
2. Поясніть фази біотермічного компостування?
3. Де використовується гумус?
4. Які рівні виділяють при компостуванні у валках?
5. Відповідно до умов компостування на які види воно ділиться?

Метаногенез як біоенергетичний процес

Метанова ферментація – класичний процес перетворення біомаси на енергію анаеробним розкладом органічних компонентів біомаси з утворенням великої кількості біогазу.

Біогаз – горючий газ, що утворюється у процесі анаеробної метанової ферментації біомаси і складається переважно з метану (55...85%), двоокису вуглецю (15...45%) і домішок сірководню, аміаку, оксидів азоту та інших.

Енергетична цінність 1 м³ біогазу, який складається на 50% з метану, досягає 17,8 МДж, а при збільшенні вмісту метану до 70 %, його енергетичний потенціал підвищується до 25 МДж (6 кВт електроенергії). Енергетична цінність таких традиційних енергоносіїв, як природний газ і рідке паливо, з розрахунку на 1 м³ і 1 кг складає 34 і 42 МДж відповідно.

1 м³ біогазу еквівалентний енергії, яка міститься в: 0,65 м³ природного газу, 0,7 л нафти, 0,65 л дизельного пального, 0,64 л бензину, 0,6 л керосину, 3,5 кг дров та 1,5 кг кам'яного вугілля.

Розкладання біомаси відбувається в результаті хіміко-фізичних процесів і симбіотичної життєдіяльності головним чином 3-х груп бактерій, при цьому продукти метаболізму одних є продуктами харчування інших в певній послідовності. Перша група – гідролітичні бактерії, друга – кислотоутворюючі, третя – метаноутворюючі.

Швидкість розкладання органічних речовин залежить від характеристик і маси сировини, температури та оптимально обраного часу тривалості процесу. Оптимальна температура ферментації становить близько 30...35°C для мезофільних бактерій і 50...60°C – для термофільних. Для підтримання таких температур у ферментаційному середовищі використовується 20...50% від одержаного біогазу, оскільки метаногенез є ендотермічним процесом.

Біогаз можна отримувати двома основними біотехнологічними методами:

- за періодичним методом бродіння біомаси;
- за безперервним методом бродіння біомаси.

Типи ферментації:

- рідиннофазна ферментація;
- твердофазна ферментація.

Метанову ферментацію переважно використовують:

- для очищення промислових стічних вод, стоків дріжджових заводів (без попередньої підготовки, при значній концентрації забруднень);
- для деградації твердих відходів сміттєзвалищ чи залишків технічних рослин агропромислового комплексу;
- для знешкодження рідких відходів тваринницьких ферм;
- частково для отримання електричної енергії чи біопалива при утилізації цих відходів.

Характеристика асоціації мікроорганізмів – продуцентів біогазу

Гідролітичні бактерії. Ця функціональна група бактерій гідролізує макромолекули до розчинних продуктів, які можуть бути перетворені в низькомолекулярні органічні сполуки.

Серед продуктів гідролізу найбільше значення мають:

- органічні кислоти – оцтова, пропіонова, масляна, капронова, мурашина, молочна, бурштинова;
- спирти й кетони – метанол, етанол, ізопропіловий спирт, бутанол, гліцерин, ацетон;
- гази – водень, метан, діоксид вуглецю;
- ферменти – целюлаза, алкогольдегідрогеназа;
- вітаміни – B₂ і B₁₂.

Кількісний вміст: між $10^5 \dots 10^6$ і $10^8 \dots 10^9$ клітин гідролітичних бактерій на 1 мл анаеробного активного мулу, або $10^{10} \dots 10^{11}$ клітин на 1 г органічних речовин у мулі.

Видовий склад: спорулюючі й неспорулюючі грам-позитивні палички, такі як протеолітичні *Eubacterium*, целюлолітичні *Clostridium*, *Acetobacterium*, облигатні анаероби, такі як *Bacteroides* і *Bifidobacteria* і факультативні анаероби *Streptococcus* і *Enterobacteriaceae*, грам-позитивні коки *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Streptococcus*.

Гетероацетогенні бактерії. Ця група бактерій здійснює симбіотичну ацетогенну дегідрогенізацію жирних кислот з довшим, ніж в оцтової кислоти, ланцюгом (пропіонова, масляна, бензойна) яка є лімітуючою стадією при утворенні метану.

Кількісний вміст: $4,2 \times 10^6$ клітин на 1 мл сирого мулу.

Видовий склад: гомоацетогенні бактерії, такі як *Acetobacterium woodi*, гетероацетогенні бактерії: *Synthrobacter wolinii* (грам-негативна паличка) і *Synthrophomonas wolfii* (нефототрофна бактерія).

Метаногенні бактерії. Ця трофічна група вирізняється на основі специфічних субстратів, використовуваних для утворення метану:

- підгрупа А – хемолітотрофні бактерії, які перетворюють водень і діоксид вуглецю в метан, використовуючи газоподібний водень як джерело електронів;
- підгрупа В – ацетотрофні бактерії, які перетворюють оцтову й мурашину кислоту, метанол і метиламіни в метан.

Кількісний вміст: $10^6 \dots 10^8$ клітин в 1 мл мезофільного сирого мулу.

Видовий склад: грам-позитивні й грам-негативні мікроорганізми, нитковидні бактерії, рухливі й нерухливі палички, коки й ланцетоподібні архебактерії родів *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanococcus*, *Methanosarcina* і *Methanotherix*. З них такі види, як *Methanosarcina barkeri*, *Methanococcus mazei* і *Methanotherix soehngenii*.

Сировина для виробництва біогазу

Як джерела сировини для виробництва біогазу можуть використовуватися як органічні агропромислові чи побутові відходи, так і рослинна сировина – силос кукурудзи, трав'яний силос, зерно і силос злакових культур. Найбільш придатними для виробництва біогазу видами відходів агропромислового комплексу є:

- гній свиней та ВРХ, послід птиці;
- бадилля овочевих культур;
- некондиційний урожай злакових та овочевих культур, цукрових буряків, кукурудзи;
- жом і меляса;
- барда спиртова;

- дробина пивна, солодові паростки, білковий відстій;
- відходи крохмально-патокового виробництва;
- вичавки фруктові та овочеві;
- сироватка і маслянка.

Кількість субстратів/видів відходів, що використовуються для виробництва біогазу в межах однієї біогазової установки, може варіюватися від одного до десяти і більше. Залежно від типів і кількості видів застосовуваних субстратів існують різні варіанти технологічних схем біогазових станцій. У разі застосування декількох субстратів, що відрізняються властивостями, наприклад, рідких і твердих відходів, їх накопичення, попередня підготовка (подрібнення, біоактивізація, підігрів, гомогенізація або інша фізико-хімічна обробка) проводиться окремо, після чого вони або змішуються перед подачею в біореактори, або подаються роздільними потоками.

Використання попередньої підготовки у ряді випадків дозволяє домогтися збільшення швидкості і ступеня розпаду сировини в біореакторах, а отже – загального виходу біогазу.

Технологічні особливості виробництва біогазу

Основними структурними елементами схеми типової біогазової установки є:

- Система прийому та попередньої підготовки субстратів;
- Система транспортування субстратів в межах установки;
- Біореактори (ферментери) з системою перемішування;
- Система обігріву біореакторів;
- Система відведення та очищення біогазу від домішок сірководню і води;
- Накопичувальні ємності зброженої маси та біогазу;
- Система програмного контролю та автоматизації технологічних процесів.

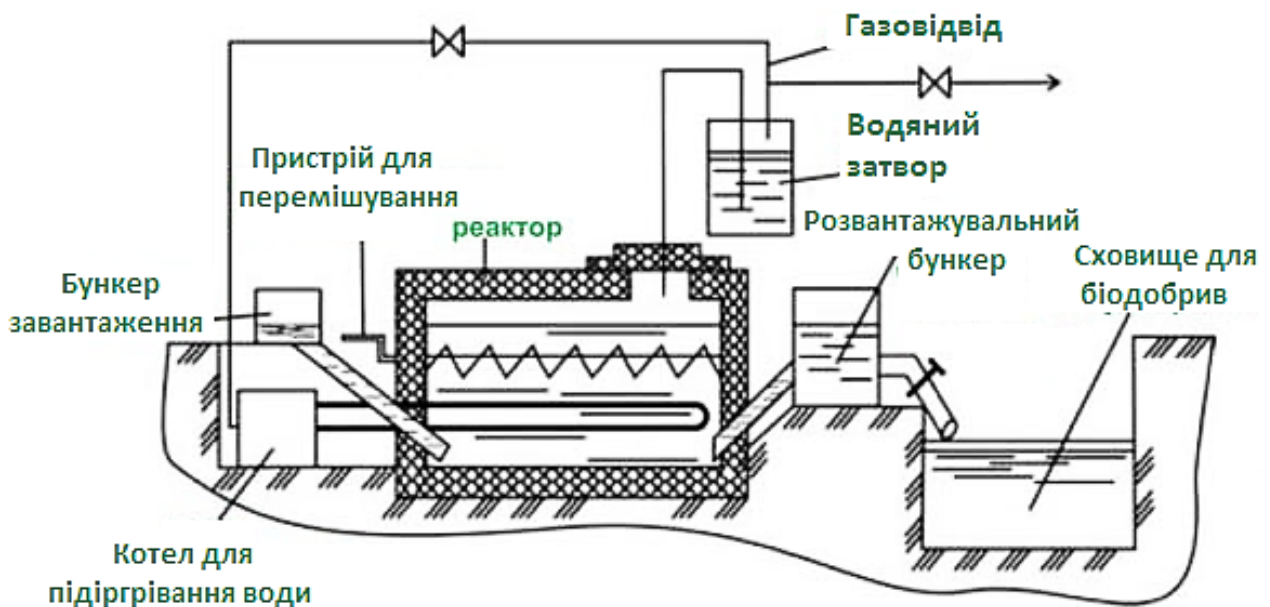


Рис. 6. Загальна схема біогазової установки.

Питання для контролю:

1. Що таке біогаз?

2. Що таке метанова ферментація?
3. Методи отримання біогазу?
4. Охарактеризуйте асоціації мікроорганізмів – продуцентів біогазу.
5. Яка сировина використовується для виробництва біогазу?
6. Технологічні особливості виробництва біогазу.

Література

1. Андріяш Г. С., Заболотна Г. М., Шульга С. М. Мутантні штами мікроорганізмів - продуцентів лізину та треоніну. *Biotechnologia Acta*. 2014. Вип 7, № 3. С. 95-101.
2. Ветеринарна біотехнологія : підручник / М. Д. Безуглий та ін. Харків : Гімназія, 2012. 464 с.
3. Буценко Л. М., Пирог Т. П. Біотехнологічні методи захисту рослин : підручник. Київ : Ліра-К, 2018. 346 с.
4. Буценко Л. М. Біотехнологічні методи захисту рослин : конспект лекцій для студ. спец. 8.05140105 «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» ден. та заоч. форм навчання. Київ : НУХТ, 2013. 95 с.
5. Васильківська М. К., Пенчук Ю. М. Сучасний стан та перспективи біотехнологічних методів виробництва амінокислот. *Ukrainian food journal*. 2012. № 2. С. 51-54.
6. Біотехнологія : підручник / В. Г. Герасименко та ін. Київ : ІНКОС. 647.
7. Калетнік Г. М., Пришляк В. М. Біопаливо: ефективність його виробництва та споживання в АПК України : навч. посіб. Київ : Хай-Тек Прес, 2010. 312 с.
8. Красінько В. О. Біоенергетика та охорона довкілля : конспект лекцій. Київ : НУХТ, 2018. 135 с.
9. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології : лаб. практикум / за ред. Д. М. Говорун ; НАН України, Ін-т молекулярної біології і генетики. Київ : Академперіодика, 2010. 232 с.
10. **Не чинний! ДСТУ ISO/TS 11133-1:2005. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Настанови щодо готування та виробництва поживних середовищ. Частина 1. Загальні настанови щодо виготовлення поживних середовищ гарантованої якості в лабораторії. Чинний від 2008-03-01. Вид. офіц. Київ : ДП «УкрНДНЦ», 2007. 12 с.**
11. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.
12. Пирог Т. П., Конон А. Д. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу практично важливих вторинних метаболітів. *Наукові праці НУХТ*. 2010. Вип. 33. С. 32-35.
13. Трохимчук І., Плюта Н., Логвиненко І., Сачук Р. Біотехнологія з основами екології: навчальний посібник. Київ : Видавничий дім Кондор, 2019. 304 с.
14. Федоренко В. О., Осташ Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів : навчальний посібник. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 282 с.
15. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль, М. І. Біотехнологія: навчальний посібник / за ред. М. І. Гиль. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/1025>.

16. Юлевич О. І., Луговий С. І., Каратєєва О. І., Баркаръ Є. В. Біотехнології та біоінженерія. Вступ до фаху : навчальний посібник. Миколаїв : МНАУ, 2022. 285 с. URL: <http://172.16.0.31:8080/jspui/handle/123456789/11705>.

Навчальне видання

Сільськогосподарська біотехнологія

Методичні рекомендації

Укладач: **Каратєєва** Олена Іванівна

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 8,25

Тираж 20 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.