

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ. ЧАСТИНА 1. ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Навчальний посібник

Рекомендовано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
як навчальний посібник для здобувачів ступеня бакалавра
за освітньою програмою «Регенеративна та біофармацевтична інженерія»
спеціальності 163 Біомедична інженерія

Укладачі: В. В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько

Електронне мережне навчальне видання

Київ
КПІ ім. Ігоря Сікорського
2022

Рецензент

доцент кафедри біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології
к.т.н., с.н.с. *Маринченко Л. В.*

Відповідальний
редактор

Галкін О. Ю., д.б.н., проф.

*Гриф надано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
(протокол № 6 від 24.06.2022 р.)
за поданням Вченої ради факультету біомедичної інженерії
(протокол № X від DD.MM.YYYY р.)*

У навчальному посібнику «Біотехнологія та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології: рекомендації до виконання лабораторних робіт» викладено необхідну для студентів інформацію для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біотехнологія та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології». Запропонований посібник містить всю необхідну для здобувачів інформацію при підготовці до лабораторної роботи, її виконанню, в тому числі рекомендації з техніки безпеки відносно роботи в навчальній лабораторії. У навчальному посібнику приділено увагу логічному та послідовному викладенню щодо виконання лабораторних робіт, обробці отриманих результатів та їх аналізу. В посібнику лабораторні роботи наведено таким чином, щоб здобувачі отримали логічні структуровані знання після закінчення її вивчення. У протоколі до кожної лабораторної роботи наведено теоретичні відомості, в яких міститься вся необхідна інформація для обґрунтування отриманих результатів та розуміння структури та особливостей дослідів, що проводяться під час виконання роботи. У навчальному посібнику запропоновано рекомендації відносно підготовки протоколів лабораторних робіт та їх захисту, також наведено інформацію про систему оцінювання роботи та вимоги, що висуваються до здобувача й результатів його роботи.

Навчальний посібник «Біотехнологія та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології: рекомендації до виконання лабораторних робіт» призначений для здобувачів ступеня бакалавра за спеціальністю 163 Біомедична інженерія, освітньою програмою «Регенеративна та біофармацевтична інженерія», та може буди також корисним для здобувачів, які навчаються за сумісними спеціальностями та освітніми програмами.

Реєстр. № НП 21/22-698. Обсяг 3,7 авт. арк.

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
проспект Перемоги, 37, м. Київ, 03056
<https://kpi.ua>

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру видавців, виготовлювачів
і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 5354 від 25.05.2017 р.

© КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ТА ОХОРОНА ПРАЦІ ПІД ЧАС РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ.....	6
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1 АНАЛІЗ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ.....	18
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2 ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЦІЛЕЙ.....	30
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3 МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ВОДИ, ПОВІТРЯ, ОБЛАДНАННЯ ТА ПЕРСОНАЛУ ЛАБОРАТОРІЇ.....	37
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4 ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ НАКОПИЧЕНОЇ БІОМАСИ ТА СИНТЕЗОВАНИХ МЕТАБОЛІТІВ ПІСЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ГЛИБИННИМ СПОСОБОМ	50
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5 ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ В ДЕЗІНТЕГРОВАНІЙ КУЛЬТУРІ ПРОДУЦЕНТУ	59
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6 ВИВЧЕННЯ СПОСОБІВ ЯКІСНОГО АНАЛІЗУ АНТИБІОТИКІВ РІЗНИХ ГРУП ПРИНАЛЕЖНОСТІ	71
РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ПІДГОТОВКИ, ВИКОНАННЯ ТА ЗАХИСТУ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ.....	79
ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ.....	81

ВСТУП

Освітній компонент «Основи біотехнології та біоінженерії-1. Теоретичні основи біотехнології» є базовою дисципліною підготовки здобувачів освітнього ступеня бакалавра за освітньою програмою «Регенеративна та біофармацевтична інженерія» спеціальності 163 Біомедична інженерія. У межах вивчення передбачено, що студенти отримають знання щодо: різноманіття біотехнологічних продуцентів та особливостей використання кожного їх виду, підготовки біотехнологічних процесів та їх складових (сировина, матеріали, комунікації, персонал, обладнання тощо), проведення біотехнологічних процесів та їх особливостей залежно від біологічних об'єктів, виділення та очистки цільових продуктів біосинтезу залежно від їх кінцевого призначення, а також переробки та утилізації відходів з використанням біотехнологічних процесів.

Вивчення дисципліни дасть змогу студентам опанувати основні фахові компетентності, передбачені освітньою програмою, а саме: здатність вивчати та застосовувати нові методи та інструменти аналізу, моделювання, проєктування та оптимізації медичних приладів та систем; здатність ефективно використовувати інструменти та методи для аналізу, проєктування, розрахунку та випробувань при розробці біомедичних продуктів і послуг; здатність аналізувати біологічні об'єкти різних форм організації (акаріоти, прокаріоти, еукаріоти: клітини та тканини людини й тварин) та окремі їх частини (білки, нуклеїнові кислоти тощо) використовуючи біологічні, хімічні, фізичні та математичні методи; здатність проєктувати та організовувати виробничі процеси за участю біологічних об'єктів різних форм організації (біологічних агентів) для отримання продуктів біосинтезу чи біотрансформації оздоровчого, профілактичного або лікувального (біофармацевтичного) призначення або для розробки біомедичних технологій; здатність до інтегрованого використання інженерних та біологічних методів для розробки, проєктування, реалізації регенеративних та біофармацевтичних технологій, а також інженерних основ трансляційної медицини.

Невід'ємною частиною опанування даної освітньої компоненти для

формування зазначених знань та фахових компетентностей є практична підготовка здобувачів, яка може сформуватися при виконанні лабораторних робіт. При виконанні лабораторних робіт формуються навички та уміння, необхідні практичної реалізації отриманих теоретичних знань та їх реалізації в умовах реальної лабораторії. А саме: студенти навчаються працювати в мікробіологічній лабораторії, проводити дослідження по біосинтезу за допомогою біологічних агентів, опановувати методи аналізу складу поживних середовищ, компонентів культуральної рідини, біомаси продуцентів, продуктів біосинтезу (первинних та вторинних метаболітів) тощо. Під час проведення досліджень здобувачі навчаються працювати з лабораторним устаткуванням, в тому числі устаткуванням для проведення біотехнологічних процесів та аналізів для визначення якісного та кількісного складу поживних середовищ, культуральних рідин тощо.

Представлений початковий посібник необхідний для допомоги студентам у підготовці та виконанні лабораторних робіт, передбачених навчальним планом. Протоколи лабораторних робіт побудовані таким чином, щоб надати студентам повну інформацію про тему, мету, необхідне обладнання, матеріали, реактиви та послідовність виконання роботи. Кожна робота містить основні теоретичні відомості, в яких обґрунтовано теоретичні основи досліджень, що будуть виконуватися здобувачами на практиці. У кінці роботи надано рекомендації по обробці отриманих результатів та перелік запитань для самоперевірки, які дозволять студенту підготуватися до захисту лабораторної роботи. Окрім, рекомендацій до виконання лабораторних робіт навчальний посібник містить «Правила техніки безпеки та охорони праці під час роботи в лабораторії» та рекомендації щодо оформлення протоколів, підготовки до виконання роботи та захисту, а також наведено систему оцінювання лабораторних робіт.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ТА ОХОРОНА ПРАЦІ ПІД ЧАС РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ

1 Загальні вимоги охорони праці під час роботи в лабораторії

1.1 До роботи в лабораторії допускаються особи, які пройшли вступний інструктаж з техніки безпеки та охорони праці в лабораторії.

1.2 Проходження інструктажу є обов'язковим для всіх прийнятих на роботу незалежно від їх освіти, стажу роботи та посади, а також для студентів, які виконують лабораторні роботи, передбачені навчальним планом, проходять практику або проводять дослідження в рамках виконання дипломної роботи або магістерської дисертації.

1.3 Періодичний інструктаж з техніки безпеки на робочому місці проводять двічі на рік або перед початком вивчення кожної дисципліни, силабусом якої передбачено виконання лабораторних робіт.

1.4 Перед виконанням студентами нових видів робіт, перед роботою з новими приладами або новими (особливо небезпечними) речовинами, а також в разі порушення студентами правил техніки безпеки проводять позаплановий інструктаж.

1.5 Проведення всіх видів інструктажу реєструють в журналі.

1.6 Розпорядженням по лабораторії призначаються відповідальні за дотриманням правил техніки безпеки в кожному робочому приміщенні, правильне зберігання легкозаймистих, вибухонебезпечних і отруйних речовин, санітарний стан приміщень, забезпеченість засобами індивідуального захисту та аптечками першої допомоги з необхідним набором медикаментів.

1.7 Проведення вступного інструктажу, контроль виконання правил техніки безпеки у всій лабораторії і ведення журналу інструктажу здійснює призначена завідуючим лабораторією посадова особа.

1.8 Усі працюючі в лабораторії повинні бути забезпечені необхідним спецодягом та засобами індивідуального захисту.

2 Засоби індивідуального захисту

2.1 Під час роботи в лабораторії необхідно одягати халат з бавовняної тканини.

2.2 Під час виконання робіт, пов'язаних з виділенням отруйних газів і пилу, для захисту органів дихання слід застосовувати респіратори або інші засоби захисту.

2.3 Під час роботи з їдкими і отруйними речовинами додатково застосовують фартухи, засоби індивідуального захисту очей і рук.

2.4 Для захисту рук від дії кислот, лугів, солей, розчинників застосовують спеціальні гумові рукавички. На рукавичках не повинно бути порізів, проколів та інших пошкоджень. Для захисту рук від дії високих температур слід використовувати бавовняні або інші термостійкі захисні рукавички.

2.5 Для захисту очей застосовують окуляри різних типів, щитки, маски.

3 Правила пожежної безпеки в лабораторії

Всі приміщення лабораторії повинні відповідати вимогам пожежної безпеки та мати засоби пожежогасіння.

3.1 Лабораторія повинна бути оснащена пожежними кранами (не менше одного на поверх) з пожежними рукавами. У кожному робочому приміщенні повинні бути наявні вогнегасники.

3.2 У приміщенні лабораторії на видному місці повинен бути розміщений план евакуації співробітників у разі виникнення пожежі.

3.3 Всі протипожежні заходи організовує група (3-5 чоловік), яка призначається розпорядженням по лабораторії з числа співробітників і проходить інструктаж з протипожежної безпеки від місцевої пожежної команди.

3.4 Всі, хто працює в лабораторії, повинні знати правила поводження з вогне- та вибухонебезпечними речовинами, газовими приладами, а також повинні вміти користуватися протигазом, вогнегасником та іншими засобами пожежогасіння, наявними в лабораторії.

3.5 У приміщеннях лабораторії і в безпосередній близькості від них (в коридорах, під сходами) заборонено зберігати горючі матеріали і встановлювати предмети, які загороджують проходи і доступ до засобів пожежогасіння.

3.6 Без дозволу завідувача лабораторією та особи, відповідальної за протипожежні заходи, заборонено установку лабораторних і нагрівальних приладів, їх використання та монтаж електропроводки.

3.7 Всі нагрівальні прилади повинні бути встановлені на термоізолюючих підставках.

3.8 Заборонено експлуатацію несправних лабораторних і нагрівальних приладів.

3.9 Після закінчення роботи необхідно відключити електроенергію, газ та воду у всіх приміщеннях.

3.10 Особа, що працює в лабораторії, яка помітила пожежу, задимлення або інші ознаки пожежі, зобов'язана: негайно сповістити пожежну службу по телефону; довести до відома завідувача лабораторією, який, у свою чергу, повинен сповістити співробітників та студентів, вжити заходи для їх евакуації та ліквідації пожежі; а також заходи щодо обмеження поширення вогню та ліквідації пожежі.

4 Правила електробезпеки в лабораторії

Всі приміщення лабораторії повинні відповідати вимогам електробезпеки під час роботи з електроустановками.

4.1 Все електрообладнання з напругою понад 36 В, а також обладнання та механізми, які можуть виявитися під напругою, повинні бути надійно заземлені.

4.2 Для відключення електромереж на входах повинні бути рубильники або інші доступні пристрої. Відключення всієї мережі, за винятком чергового освітлення, проводиться загальним рубильником.

4.3 З метою запобігання електротравматизму заборонено: працювати на несправних електричних приладах і установках; перенавантажувати електромережу; переносити і залишати без нагляду ввімкнені електроприлади;

працювати поблизу відкритих частин електроустановок, торкатися до них; заборонено прохід до електричного пристрою.

4.4 Про всі виявлені дефекти в ізоляції проводів, несправності рубильників, штепсельних вилок, розеток, а також заземлення та огорожень слід негайно повідомити електрика.

4.5 У разі перерви в подачі електроенергії електроприлади повинні бути негайно вимкнені.

4.6 Заборонено використання в межах одного робочого місця електроприладів класу «0».

4.7 Категорично заборонено торкатися до корпусу пошкодженого приладу або струмопровідних частин з порушеною ізоляцією і одночасно до заземленого обладнання (інший прилад зі справним заземленням, водопровідні труби, опалювальні батареї), або торкатися до ушкодженого приладу, стоячи на вологій підлозі.

4.8 У разі ураження електричним струмом необхідно якомога швидше звільнити потерпілого від дії електричного струму, відключивши електроприлад, якого торкається потерпілий. Відключення проводиться за допомогою вимикача або рубильника.

4.9 У разі неможливості швидкого відключення електроприладу необхідно звільнити потерпілого від струмопровідних частин дерев'яним або іншим предметом, який не проводить струм.

4.10 У всіх випадках ураження електричним струмом необхідно викликати лікаря.

5 Правила зберігання реактивів

5.1 Загальні положення зберігання реактивів.

5.1.1 Лабораторні запаси реактивів повинні зберігатися в спеціально обладнаних, добре вентильованих, сухих місцях, згідно з правилами безпеки.

5.1.2 У разі розміщення реактивів у лабораторії слід неухильно дотримуватися порядку сумісного зберігання горючих і вибухонебезпечних

речовин.

5.1.3 Не дозволено сумісне зберігання реактивів, здатних реагувати один з одним з виділенням тепла або горючих газів. Заборонено також спільно зберігати речовини, які в разі виникнення пожежі не можна гасити одним вогнегасним засобом.

5.1.4 Основним правилом зберігання і відбору реактивів є запобігання їх забруднення.

5.1.5 На всіх упаковках з реактивами повинні бути етикетки із зазначенням назви, кваліфікації та строку придатності.

5.1.6 Реактиви, які не можна зберігати в скляній тарі, поміщають в тару з матеріалів, стійких до дії даного реактиву. Наприклад, плавикову кислоту і луги зберігають в бутлях з поліетилену.

5.1.7 Реактиви, що розкладаються або змінюють свої властивості під дією світла (наприклад, діетиловий ефір, пероксиди, солі срібла), зберігають у склянках з темного або жовтого скла.

5.1.8 Гігроскопічні речовини і речовини, що окиснюються у разі контакту з повітрям, повинні зберігатися в герметичній тарі. Для герметизації пробок використовують парафін.

5.1.9 Відпрацьовані реактиви необхідно зливати в окремі ємності для подальшої переробки або передачі в організації, що займаються утилізацією хімічних речовин. **Зливати концентровані кислоти, луги, отруйні і горючі речовини в каналізацію заборонено!**

5.2 Зберігання хімічних реактивів в лабораторії.

5.2.1 У робочих приміщеннях допускається зберігати нелеткі, не пожежонебезпечні і малотоксичні тверді речовини і водні розчини, розбавлені кислоти і луги, в кількостях, необхідних для аналізів.

5.2.2 Концентровані кислоти в обсязі не більше 2 дм³ зберігають в скляному посуді з притертими скляними кришками або пластмасовими пробками в ексикаторі або скляній ємності з кришкою у витяжній шафі. Для кращої герметичності надягають гумові ковпачки.

5.2.3 Концентровані розчини лугів зберігають у витяжній шафі, окремо від

кислот, в поліетиленовій тарі. Разом з лугами можна зберігати аміак.

5.2.4 Зберігання легкозаймистих рідин (ЛЗР) допускається в товстостінних, забезпечених герметичними пробками бутлях, місткістю не більше 1 дм³, особливо небезпечні ЛЗР – в обсязі не більше добової потреби. Бутлі з ЛЗР поміщають в спеціальні металеві ящики далеко від джерел тепла і окиснювачів (хлоратів, нітратів, азотної кислоти, перекису водню, перманганатів).

5.2.5 Органічні речовини з різким запахом (піридин, ізоаміловий спирт та ін.) зберігаються в тарі з добре закритими пробками та гумовими ковпачками.

5.2.6 Металева ртуть та інші отруйні речовини зберігають у шафах, що замикаються (сейфах), у суворій відповідності до інструкцій з їх зберігання.

5.2.7 Їдкі речовини (залізо трихлористе, йод, триетаноламін, валеріанова, пропіонова та ін. органічні кислоти), зберігають в скляному посуді з пробками в металевому ящику під витяжною шафою. Для кращої герметичності на пробки надягають гумові ковпачки.

5.3 Правила зберігання пожежонебезпечних реактивів.

До пожежонебезпечних відносяться вогнебезпечні, самозаймисті і вибухонебезпечні речовини.

5.3.1 Запаси пожежонебезпечних реактивів повинні зберігатися в ізольованих, добре вентильованих приміщеннях або в спеціальних шафах. Заборонено зберігати пожежонебезпечні реактиви поруч з опалювальними приладами і в місцях, де вони підлягають дії прямих променів сонця. **Гасити пожежу таких речовин водою і повітряно-механічною піною неприпустимо!**

5.3.2 У місцях зберігання пожежонебезпечних реактивів заборонено розміщувати сторонні предмети і меблі, які перешкоджають доступу до засобів пожежогасіння.

5.3.3 Зберігання пожежонебезпечних речовин допускається в строго відповідній тарі, яка має етикетки з точним найменуванням речовини і написом «Вогнебезпечно» («Вибухонебезпечно»).

5.3.4 Спільне зберігання в одному приміщенні самозаймистих, вогнебезпечних та вибухонебезпечних речовин заборонено. У разі відсутності окремих приміщень допускається зберігання невеликих кількостей (10-15 г)

вищеназваних речовин в одному приміщенні, але в окремих, щільно закритих залізних шафах.

5.3.5 Заборонено також спільно зберігати речовини, які здатні у разі взаємодії викликати утворення полум'я або виділяти велику кількість тепла.

6 Правила роботи з хімічними речовинами

6.1 Загальні положення.

Під час роботи в хімічній лабораторії необхідно дотримуватися вимог техніки безпеки.

6.1.1 Під час роботи з хімічними реактивами в лабораторії має знаходитися не менше двох осіб. **Виконання робіт в лабораторії студентами без супроводу викладача або інженера заборонене!**

6.1.2 Приступаючи до роботи, потрібно оглянути і привести в порядок своє робоче місце, звільнити його від непотрібних для роботи предметів.

6.1.3 Перед роботою необхідно перевірити справність обладнання, рубильників, наявність заземлення та ін.

6.1.4 Роботу з їдкими і отруйними речовинами, а також з органічними розчинниками проводять тільки у витяжних шафах.

6.1.5 Заборонено набирати реактиви в піпетки ротом, для цієї мети слід використовувати гумову грушу або інші пристрої.

6.1.6 Для визначення запаху хімічних речовин слід нюхати обережно, направляючи до себе пари або газу рухом руки.

6.1.7 Роботи, в процесі проведення яких можливе підвищення тиску, перегрів скляного приладу або його поломка з розбризкуванням гарячих або їдких продуктів, також виконують у витяжних шафах. Виконавець роботи повинен надіти захисні окуляри (маску), рукавички і фартух.

6.1.8 Під час виконання робіт у витяжній шафі стулки шафи слід піднімати на висоту не більше 20-30 см так, щоб у шафі знаходилися тільки руки, а спостереження за ходом процесу вести через скло шафи.

6.1.9 Під час роботи з хімічними реактивами необхідно вмикати і вимикати

втяжну вентиляцію не менше ніж за 30 хв до початку і після закінчення робіт.

6.1.10 Змішування або розведення хімічних речовин, що супроводжується виділенням тепла, слід проводити в термостійкому або фарфоровому посуді.

6.1.11 Під час упарювання в стаканах розчинів слід ретельно перемішувати їх, оскільки нижні і верхні шари розчинів мають різну щільність, внаслідок чого може статися викидання рідини.

6.1.12 Щоб уникнути опіків, уражень від бризок і випарів, не можна нахилитися над посудом, в якому відбувається кипіння чи нагрівання рідини.

6.1.13 Нагрівати посуд зі звичайного скла на відкритому вогні без азбестованої сітки заборонено.

6.1.14 Під час нагрівання рідини в пробірці тримати її слід отвором в сторону від себе і від інших.

6.1.15 За жодних обставин не можна допускати нагрівання рідин в колбах або приладах, що не сполучаються з атмосферою.

6.1.16 Нагріту посудину не можна закривати притертою пробкою доти, поки вона не охолоне до температури навколишнього середовища.

6.2 Робота з кислотами і лугами.

6.2.1 Роботу з концентрованими кислотами і лугами проводять тільки у втяжній шафі і з використанням захисних засобів (рукавичок, окулярів). Під час роботи з парами азотної кислоти з питомою густиною 1,51-1,52 г/см³ або з олеумом слід також надягати гумовий фартух.

6.2.2 Концентровані азотна, сірчана, соляна кислоти повинні зберігатися у втяжній шафі в скляному посуді ємністю не більше 2 дм³. У місцях зберігання кислот неприпустимо зберігати легкозаймисті речовини. Розбавлені розчини кислот (за винятком плавикової) також зберігають в скляному посуді, а лугів – в поліетиленовій тарі.

6.2.3 Для приготування розчинів сірчаної, азотної та інших кислот їх необхідно доливати у воду тонким струменем з безперервним помішуванням. Для цього використовують термостійкий посуд, оскільки процес розчинення супроводжується сильним розігріванням. **Доливати воду в кислоти заборонено!**

6.2.4 У разі потрапляння кислоти на шкіру уражене місце слід негайно промити протягом 10-15 хв струменем води, а потім нейтралізувати 2-5 % розчином гідрокарбонату натрію.

6.2.5 Пролиту кислоту слід засипати піском. Після прибирання піску місце, де була розлита кислота, посипають вапном або содою, а потім промивають водою.

6.3 Робота з легкозаймистими рідинами (ЛЗР).

До роботи з ЛЗР і іншими пожежонебезпечними речовинами допускаються особи, які вивчили інструкції з техніки пожежної безпеки та пройшли відповідний інструктаж.

6.3.1 Перед роботою з ЛЗР слід перевірити наявність і підготувати до використання первинні засоби пожежогасіння.

6.3.2 Заборонено проводити будь-які роботи з ЛЗР поза витяжною шафою!

6.3.3 Перегонку і нагрівання легкозаймистих рідин з низькою температурою кипіння слід проводити в круглodonних колбах, встановлених на банях, заповнених відповідним теплоносієм (вода, масло, пісок). Для нагрівання бань слід користуватися електроплитками тільки із закритими нагрівальними елементами.

6.3.4 Під час перегонки ЛЗР слід постійно стежити за роботою холодильника.

6.3.5 Заборонено нагрівати на водяних банях речовини, які можуть вступати в реакцію з водою з вибухом або виділенням газів.

6.3.6 Лабораторні установки, в яких проводили нагрівання ЛЗР, дозволено розбирати тільки після охолодження їх до кімнатної температури.

6.3.7 У разі витоку або займання ЛЗР слід вимкнути всі електронагрівальні прилади, а за необхідності знеструмити лабораторію відключенням загального рубильника. Місце витоку ЛЗР слід засипати сухим піском, а потім зібрати його дерев'яним або пластиковим совком. Застосування металевих совків заборонене.

6.3.8 Необхідно суворо стежити за тим, щоб ємності з ЛЗР не опинилися

поруч з нагрітими предметами і не освітлювалися прямими сонячними променями, тому що всередині герметично закритої ємності створюється тиск, що може викликати руйнування скляної пляшки.

6.3.9 Під час заповнення скляних пляшок ЛЗР «під пробку» за підвищення температури на 5-10 °С може відбутися руйнування бутля. Для запобігання цьому ЛЗР не доливають в бутлі приблизно на 10 см³.

6.3.10 Перекисні сполуки вимагають такої самої обережності в поводженні, як і інші пожежонебезпечні речовини. У процесі роботи з ними неприпустимо розігрівання перекисів вище температури їх розкладання.

6.3.11 Обов'язковою умовою роботи з перекисними сполуками є дотримання чистоти робочого місця, приладів і посуду.

6.3.12 Для гасіння органічних перекисів слід застосовувати воду, для неорганічних – сухий пісок, порошкові суміші і вуглекислотні вогнегасники.

6.4 Робота з твердими речовинами

6.4.1 Всі сухі реактиви необхідно брати порцеляновими ложками, шпателями. **Брати реактиви незахищеними руками заборонено!**

6.4.2 Під час зважування твердих речовин завжди треба користуватися тарою. Неприпустимо насипати речовини безпосередньо на чаші ваг.

6.4.3 Роботи з отруйними та шкідливими твердими речовинами слід проводити тільки у витяжній шафі і з усіма запобіжними заходами.

6.4.4 Необхідно проявляти обережність під час змішування твердих речовин (особливо органічних), тому що утворюється пил, який може бути вибухонебезпечним. Заборонено змішувати сухі реактиви поблизу ввімкнених електронагрівальних приладів.

6.4.5 Роботу з порошкоподібними речовинами для запобігання їх розпилення потрібно проводити в таких місцях, де немає протягів або сильного руху повітря.

6.4.6 Випадково розсипаний реактив не можна висипати назад в ту саму банку, де він зберігається.

6.5.7 Роботи з лужними металами слід проводити у витяжній шафі на чистому і сухому місці, застосовуючи мінімальні їх кількості і користуючись

захисними окулярами і гумовими рукавичками. Щоб уникнути займання лужних металів, не можна допускати попадання на них води.

6.4.8 З пожежонебезпечними реактивами слід працювати далеко від вогню і ввімкнених нагрівальних приладах.

6.5 Робота з отруйними газоподібними речовинами.

6.5.1 Роботу з отруйними газоподібними речовинами проводять обов'язково у витяжній шафі.

6.5.2 Перед роботою необхідно перевірити силу тяги у витяжній шафі. У разі поганої або недостатньої тяги працювати з отруйними газоподібними речовинами заборонено.

6.5.3 Під час виконання робіт з отруйними газоподібними речовинами необхідно мати наготові протигаз.

7 Перша допомога у разі нещасних випадків у лабораторії

7.1 Про нещасний випадок потерпілий або очевидець зобов'язаний негайно повідомити завідувача лабораторії. Очевидець повинен організувати першу допомогу потерпілому і викликати лікаря.

Під час роботи в хімічній лабораторії найбільш вірогідні такі види уражень: отруєння, поранення, опіки, втрата свідомості.

7.2 У разі поранень (неглибоких порізів) необхідно, в першу чергу, видалити з рани уламки, зупинити кровотечу, промити рану 2 % розчином перманганату калію, спиртом (або іншим антисептичним засобом) і забинтувати. У разі забруднення рани її слід обробити перексидом водню. У разі сильної кровотечі з рани на кінцівку вище рани необхідно накласти пов'язку, що давить. Кровотечу з ран на інших частинах тіла зупиняє туге перев'язування рани стерильною марлею. У разі сильної кровотечі необхідно викликати лікаря.

7.3 Опіки поділяють на термічні і хімічні.

7.3.1 Причиною термічних опіків можуть бути дотик незахищеним руками до розпечених або сильно нагрітих предметів, лабораторного обладнання, займання легкозаймистих або горючих рідин чи твердих речовин.

7.3.2 Хімічні опіки виникають у разі дії на шкіру різних хімічних речовин, головним чином, кислот і лугів.

7.3.3 Перша допомога у разі опіків як термічного, так і хімічного походження полягає у промиванні ураженого місця великою кількістю прохолодної води. Метою промивання термічного опіку є охолодження місця опіку. **Використовувати лід для охолодження обпечених ділянок шкіри заборонено!** У разі опіків третього і четвертого ступеня необхідно обов'язково звернутися до лікаря.

У разі хімічних опіків уражене місце спочатку необхідно промити великою кількістю води, після чого – слабким розчином соди (у разі опіків кислотами) або лимонної чи оцтової кислоти (у разі опіків лугами).

7.4 Перша допомога у разі втрати свідомості.

Укладіть потерпілого на рівну поверхню (на підлогу, лаву, стіл) так, щоб голова була нижче тулуба, а ноги – вище. Це забезпечить приплив крові до голови. Якщо немає можливості укласти людину, посадіть її на стілець або хоча б на підлогу, нахиливши його голову якнайнижче, щоб плечі торкалися колін.

Забезпечте доступ свіжого повітря (відкрийте вікно, якщо потерпілий знаходиться в приміщенні). Поверніть голову потерпілого набік, щоб блювотні маси не потрапили в дихальні шляхи. Звільніть від одягу, який стискає дихальні шляхи (комір, пояс). Перевірте пульс. **Якщо він відсутній або слабо відчувається, відразу ж викликайте «швидку»!**

Дайте потерпілому вдихнути пари нашатирного спирту (для цього потрібно злегка змочити ватний тампон нашатирним спиртом і потримати його на відстані 1-2 см від носа). Якщо нашатирю немає, потрібно окропити обличчя прохолодною водою або протерти рушником, змоченим у холодній воді.

Якщо, незважаючи на всі вжиті заходи, людина не приходить до тями більше 5 хвилин, викликайте «швидку допомогу»!

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

АНАЛІЗ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ

Мета роботи: ознайомитися з методами якісного та кількісного визначення флавоноїдів у рослинній сировині.

Матеріали та обладнання: штатив з пробірками, скляні палички, колби круглодонні на 100 мл, колби конічні, колби мірні на 25 мл, фільтрувальний папір, зворотній холодильник, мірний циліндр, лійки для фільтрування, водяна баня, ваги аналітичні, спектрофотометр.

Реактиви: суха рослинна сировина, етанол, сірчана кислота, магній (металічний), натрій гідроксид, заліза хлорид, свинцю ацетат, алюмінію хлорид, алюмінію хлорид, рутин, вода дистильована.

Теоретичні відомості

Флавоноїди – похідні фенольних сполук, жовті, бурі пігменти рослин, які накопичуються в усіх органах рослин у вигляді глікозидів. Група ароматичних речовин із загальною формулою $C_6-C_3-C_6$. Молекула складається з двох фенольних залишків *A* і *B*, з'єднаних пропановою ланкою, яка може замикатись в кисневмісний гетероцикл *C*. (рис. 1.1). Флавоноїди мають різноманітну фітотерапевтичну дію. Зустрічаються в багатьох рослинах у вигляді глікозидів, а також у чистому вигляді. Найбільш відомими флавоноїдами у фітотерапії є рутин, гесперидин, гіперозид, кверцетин, кемпферол та апігенін.

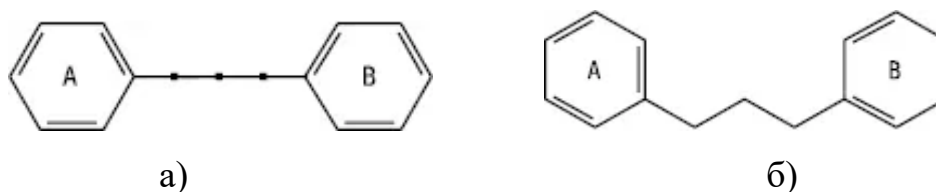


Рисунок 1.1. Загальна формула молекули флавоноїдів:

а) еуфлавоноїдів; б) ізофлавоноїдів.

Назва флаваноїдів походить від лат. *flavus* – жовтий, оскільки перші виділені флаваноїди були забарвлені у жовтий колір. Першим флаваноїдом, виділеним у 1814 році М. Е. Шевроле з *Quercus tinctoria*, був кверцитин. У 1842 році К. Вайс повідомив про виділення рутину з *Ruta graveolens*.

Класифікація флаваноїдів побудована на основі ступеня окиснення пропанового фрагменту, місця приєднання фенольного кільця до пропанового фрагменту і величини окисного циклу. Флаваноїди поділяються на 3 основні групи, які відрізняються за місцем приєднання кільця до пропанового фрагмента це – справжні флаваноїди (еуфлаваноїди, власне флаваноїди, 2-фенілбензопірани), ізофлаваноїди (3-фенілбензопірани) та неофлаваноїди (4-фенілбензопірани).

Істинні флаваноїди мають фенільний замісник біля С-2, а кетонну групу – в положенні С-4. Основною сполукою **еуфлаваноїдів** є флаван, залежно від ступеня насиченості та окиснення якого флаваноїди поділяють на похідні хроману та хромону (табл. 1.1). Класифікацію еуфлаваноїдів представлено на рис. 1.2.

Таблиця 1.1 – Класи еуфлаваноїдів

Еуфлаваноїди	
Похідні хроману	Похідні хромону
катехін (флаван-3-ол)	флаванон
лейкоантоціанідин (флаван-3,4-діол)	флаванонол
антоціанідин	флафон
	флавонол
	халкон
	дигідрохалкон
	аурон

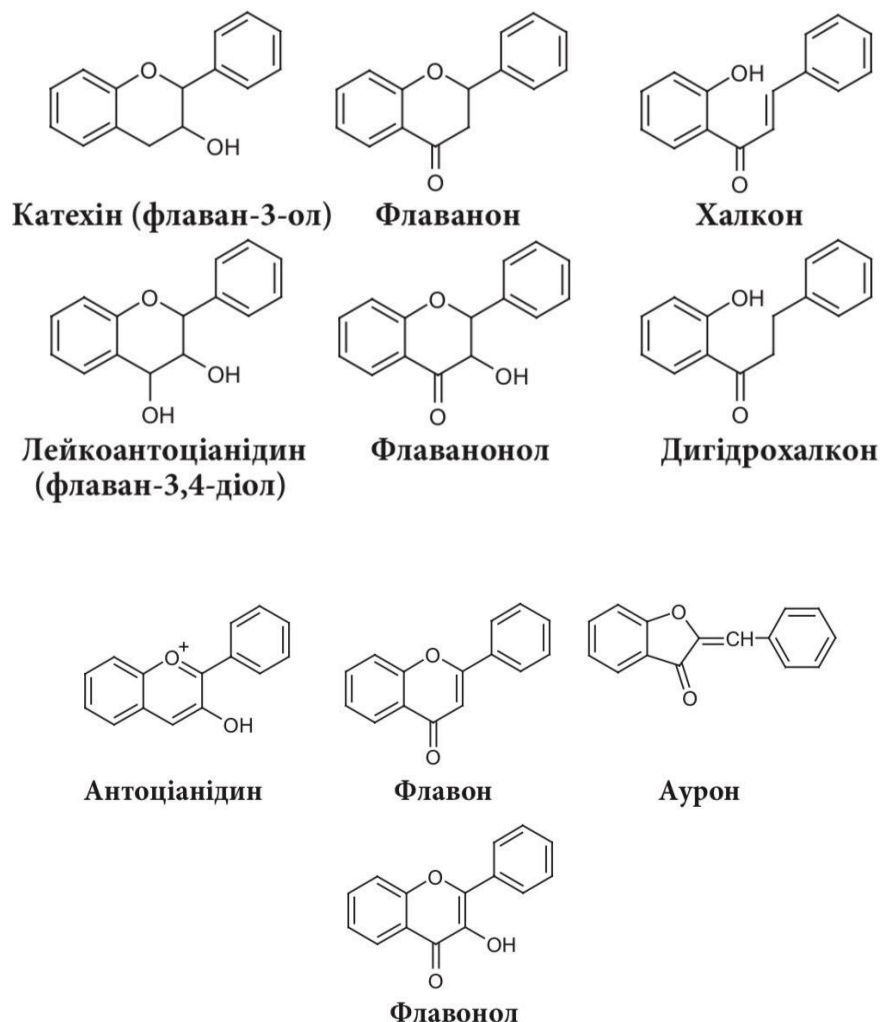


Рисунок 1.2. Основні класи еуфлавоноїдів

Ізофлавоноїди мають фенільний замісник біля С-3, кетонну групу – теж в положенні С-4. Виділяють прості (похідні ізофлавану та ізофлакону) і конденсовані похідні (птерокарпани) (рис. 1.3 та рис. 1.4).

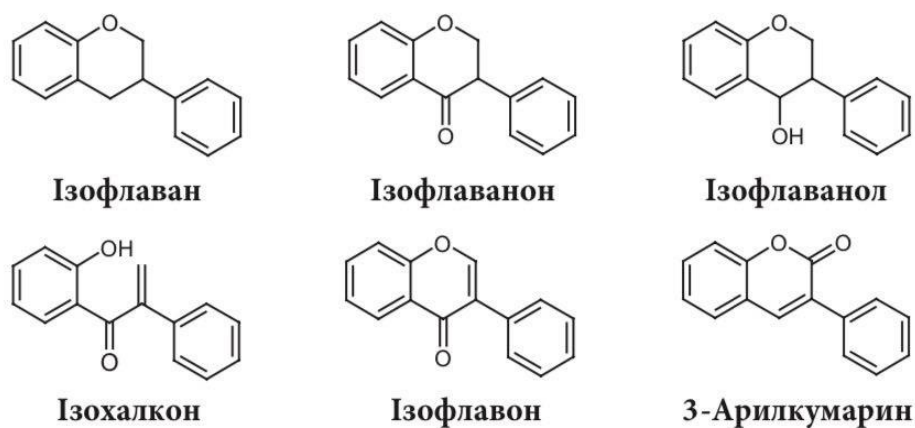


Рисунок 1.3. Прості ізофлавоноїди

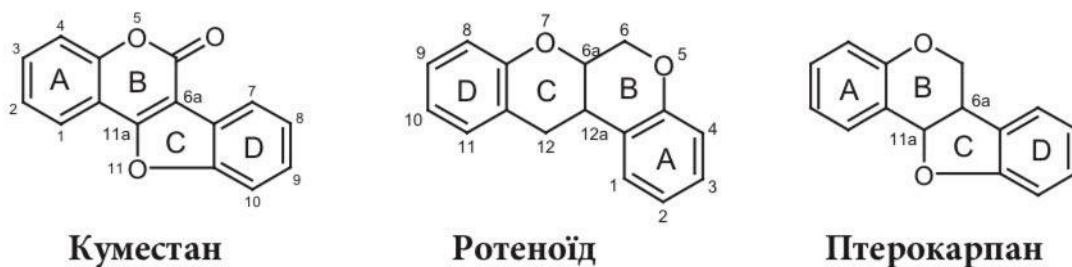


Рисунок 1.4. Конденсовані ізофлавоноїди

Неофлавоноїди мають фенільний замісник біля С-4, кетонну ж групу – навпаки, в положенні С-2. Неофлавоноїди не часто зустрічаються в рослинах, вони представлені такими класами, як неофлавани, неофлаволи, неофлаволи, неофлаволи, 4-фенілкумарини, 3,4-дигідро-4-фенілкумарини та неофлаволи (рис. 1.5).

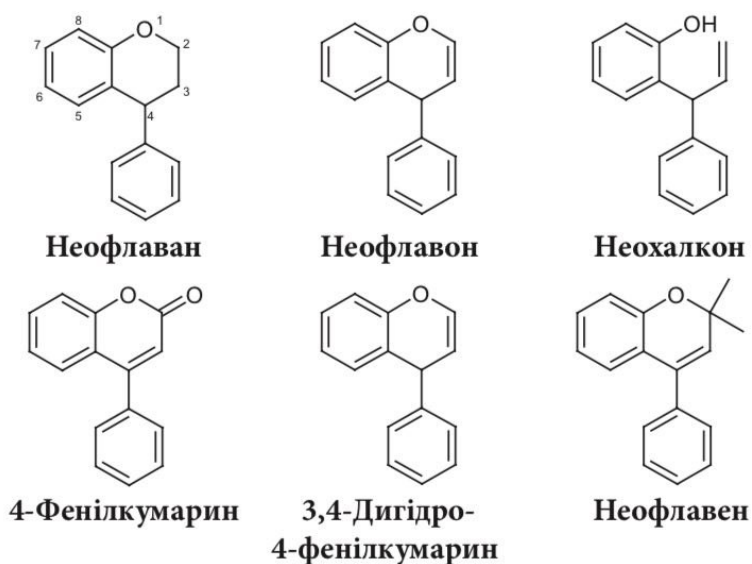


Рисунок 1.5. Основні класи неофлавоноїдів

Залежно від ступеня окиснення пропанового фрагменту їх також поділяють на катехіни, антоціани, халкони, флавонони, флаволи, флавоноли тощо.

Флавоноїди – кристалічні сполуки з певною температурою топлення. Катехіни, лейкоантоціанідини, флавані, ізофлавані, флаванони, флаваноноли – безбарвні кристали; флаволи, флавоноли, халкони, аурони – жовті або

жовтогарячі. Антоціани змінюють колір залежно від рН-середовища: в кислому – вони мають відтінки червоного кольору, в лужному – синього.

Аглікони флавоноїдів розчиняються у діетиловому ефірі, ацетоні, спиртах, практично нерозчинні у воді. Глікозиди флавоноїдів розчиняються у розбавлених спиртах, гарячій воді.

Флаваноли (катехіни) оптично активні. Так, катехін існує в чотирьох ізомерах, які відрізняються напрямком, кутом обертання та біологічною дією. Флаванони і флаваноли – лабільні сполуки. Під дією реагентів, які мають окислюючі властивості, вони можуть переходити відповідно в халкони та лейкоантоціанідини.

Флавоноїди є найпоширенішим класом фенольних сполук, які зустрічаються в рослинах як у вільному стані, так і у вигляді О- і С-глікозидів. Відомі понад 4000 речовин флавоноїдної природи, 500 з яких існують у вільному стані.

Найбагатші на флавоноїди родини бобових, гречкових, айстрових, розових. Флавоноїди найчастіше зустрічаються в молодих тканинах вищих рослин, насамперед у клітинному соку. У надземних частинах рослини понад 85 % вмісту флавоноїдів локалізовано у клітинах епідерми, і лише 15 % – в інших тканинах. Глікозиди флавоноїдів зазвичай містяться у тканинах активного росту (листя, пуп'янки, квітки), аглікони – у здерев'янілих тканинах (кора).

Близько 40 % флавоноїдів у рослинах є похідними флавонолу, близько 20 % – похідними флавону, майже 10 % – катехіни, антоціанідини, флаванони, аурони, халкони.

Флавоноїди мають широкий спектр дії на організм людини. Такі флавоноїди, як кверцетин, кверцитрин, катехін, антоціани збільшують амплітуду серцевих скорочень, нормалізують серцевий ритм. С-С-глікозиди флавоноїдів (вітексин та ін.), гіперозид діють як судинорозширювальні препарати, викликаючи гіпотензивний ефект. Спазмолітичну дію зумовлюють халкони, флаванони (ліквіритин), флаваноли (кверцетин, рутин), флаволи (апігенін). Діуретичну дію має лютеолін; високу гіпоазотемічну – робінін та інші похідні кемпферолу. Флавоноїди мають радіопротекторну дію, виводять радіонукліди.

Встановлено протипухлинну дію лейкоантоїанідинів: лейкопеларгонідину, лейкодельфінідину, лейкоціанідину. Катехіни виявляють в'язучу і протизапальну дію. Вітамін Р об'єднує різні фенольні сполуки, здатні знижувати проникність і крихкість капілярів, підвищувати їх резистентність, що пов'язано із зниженням рівня гіалуронідази, запобіганням окиснення аскорбінової кислоти і адреналіну. Ізофлавоноїди мають естрогенну та анаболізуєчу дію.

З точки зору біотехнології, додавання флавоноїдів до складу поживного середовища у вигляді фітоекстрактів стимулює підвищення біосинтетичної активності ряду продуцентів.

Для екстрагування флавоноїдів з лікарської рослинної сировини використовують нижчі спирти (етанол, метанол), гарячу воду або спирто-водні суміші. Спиртові екстракти розводять водою, випарюють до водного залишку і обробляють хлороформом для відокремлення ліпофільних речовин. Флавоноїди з очищеного водного залишку послідовно екстрагують етилацетатом (монозиди), бутанолом (біозиди, диглікозиди тощо). Для розділення суми флавоноїдів на індивідуальні компоненти використовують хроматографію на поліаміді, силікагелі, целюлозі та інших сорбентах.

Для кількісного визначення флавоноїдів запропоновано багато методів: вагові, об'ємні (потенціометричне титрування в неводних середовищах, комплексометричне титрування), флуориметричні, полярографічні, фотоколориметричні.

Але найбільшого поширення набув спектрофотометричний метод. Він базується на реакціях комплексоутворення з іонами різних металів, реакції азосполучення, з борною кислотою з подальшим визначенням оптичної густини в УФ-світлі за відповідної довжини хвилі.

Для ідентифікації всіх груп флавоноїдів не існує універсальної реакції, оскільки вони кардинально відрізняються за наявними в них активними радикалами. Цим пояснюється різноманіття використовуваних реагентів та якісних реакцій для якісного визначення флавоноїдів. В таблиці 1.2 наведено приклади якісних реакцій для виявлення різних груп флавоноїдів.

Таблиця 1.2 – Якісні реакції на різні типи флавоноїдів

№ з/п	Якісна реакція	Що спостерігається	Тип флавоноїдів
1	Ціанідинава реакція (проба Snoda)	яскраве забарвлення від помаранчевого до червоного	флавонони, флавони, флавоноли
2	Реакція з лугом	жовте забарвлення	флавони, флавоноли, флаванони
		помаранчевий та оранжево-червоний колір	халкони та аурони
		червоний колір	полігідроксифлавоноли
3	З 1 % ферум (III) хлоридом	зелений колір	флавоноли
		коричневий колір	флаванони, халкони, аурони
		червоно-бурий колір	флавони
4	Реакція Гейдж (5% -ний алюміній хлорид)	жовте забарвлення	флавони, флавоноли, та аурони
		червоне забарвлення	халкони
		помаранчеве забарвлення	аурони
		коричнево- жовте забарвлення	ізофлаволи
5	Реакція з 1–2% розчином плюмбуму	червоний осад	флавоноли
		жовтий осад	флавони, халкони, аурони

	ацетату	червоний або синій осад	антоціанідини
6	Реакція Запрометова (з 1% р-н ваніліну в кислоті хлоридній конц.)	червоно-фіолетове забарвлення	катехіни
		малинове забарвлення	димери флавоноїдів
		яскраво-жовте забарвлення	флавори та флавоноли
		яскраво червоне забарвлення	галокатехіни
		червоне або оранжеве	лейкоантоціанідини

Хід роботи

1 Виділення флавоноїдів з рослинної сировини для проведення якісних реакцій. Подрібнити сировину і просіяти через калібрувальне сито з розміром ґратки 2 мм. Помістити 3 г наважки в колбу зі шліфом на 100 мл. Залити сировину 40 мл 70 %-го етилового спирту. Закрити колбу зворотнім холодильником і кип'ятити на водяній бані протягом 30 хвилин, періодично помішуючи. Екстракт охолодити і профільтрувати.

2 Проведення якісних реакцій на флавоноїди. Як взірець для порівняння використайте 0,1%-ний розчин рутину.

2.1 Ціанідинова реакція (проба Snoda). До 1 мл очищеного екстракту (і 0,1 %-го розчину рутину) додати 2-3 краплі концентрованої соляної кислоти і 1-2 дрібки порошку металічного магнію. Спостерігати колір забарвлення, що утворився в результаті реакції.

2.2 Реакція з лугом. До 1 мл екстракту (і 0,1 %-го розчину рутину) додати 1-2 краплі 10 %-го спиртововодного розчину гідроксиду калію чи натрію.

2.3 Реакція з хлоридом заліза (III). До 1 мл екстракту (і 0,1 %-го розчину рутину) додати 2-3 краплі 1 %-го спиртового розчину хлориду заліза.

2.4 Реакція із ацетатом свинцю. До 1 мл очищеного екстракту (і 0,1 %-го розчину рутину) додати 3-5 крапель 1-2 %-го розчину основного свинцю ацетату; утворюється осад.

2.5 Реакція з розчином алюмінію хлориду (реакція Гейдж). До 1 мл екстракту (і 0,1 %-го розчину рутину) додати 2-3 краплі 5 %-го-ного спиртового розчину алюміній хлориду.

Результати якісного аналізу занести в таблицю 1.3:

Таблиця 1.3 – Результати якісного аналізу вмісту флавоноїдів в рослинній сировині

Досліджуваний об'єкт	Забарвлення				
	Ціанідинава реакція	NaOH	FeCl ₃	Pb(CH ₃ COO) ₂	AlCl ₃
0,1% розчин рутину					
Екстракт сировини					

3 Проведення кількісного визначення флавоноїдів у рослинній сировині. Для кількісного визначення застосовувати спектрофотометричну методику, яка базується на вимірюванні абсорбції комплексу алюміній хлориду з флавоноїдами. Кількісний вміст перерахувати на рутин. Паралельно проводити вимірювання абсорбції стандартного розчину рутину (розчин порівняння).

3.1 Приготування вихідного розчину. 0,5 г (точна наважка) здрібненої на порошок сировини помістити у плоскодонну колбу місткістю 100 мл, додати 60 мл 70 %-го етилового спирту, кип'ятити зі зворотним холодильником на водяній бані впродовж 30 хв, а потім охолодити до кімнатної температури. Отриманий екстракт профільтрувати у мірну колбу місткістю 100 мл через паперовий фільтр. До залишку у колбі додати 20 мл 70 %-го етилового спирту і кип'ятити зі зворотним холодильником впродовж 15 хв, охолодити і профільтрувати отриманий витяг у ту саму мірну колбу. Вилучення повторити,

застосовуючи 15 мл етанолу 70 % впродовж 15 хв, охолоджений вміст колби разом із сировиною перенести на фільтр, фільтруючи отримуваний витяг у ту саму мірну колбу. Фільтр із сировиною і колбу промити етанолом 70 %, доводячи об'єм розчину у мірній колбі до позначки.

3.2 Приготування випробовуваного розчину. 5,0 мл вихідного розчину помістити у мірну колбу місткістю 25 мл, додати 3,0 мл 3 % -го розчину алюміній хлориду і довести об'єм розчину до позначки 70 %-им етиловим спиртом, перемішати.

3.3 Приготування компенсаційного розчину. 5,0 мл вихідного розчину помістити у мірну колбу місткістю 25 мл і довести об'єм розчину до позначки 70 %-им етанолом, перемішати.

3.4 Приготування стандартного розчину рутину. 0,05 г (точна наважка) рутину помістити у мірну колбу місткістю 100 мл і розчинити в етанолі 70 %-му: довести об'єм розчину до позначки, перемішати.

3.5 Приготування розчину порівняння. 1,0 мл стандартного розчину рутину помістити у мірну колбу місткістю 25 мл, додати 3,0 мл 3 %-го розчину алюміній хлориду і довести об'єм розчину до позначки етанолом 70 %-им, перемішати.

3.6 Приготування компенсаційного розчину рутину. 1,0 мл стандартного розчину рутину помістити у мірну колбу місткістю 25 мл і довести об'єм розчину до позначки етанолом 70 %-им, перемішати.

3.7 Визначення оптичної густини вимірювальних розчинів. Через 45 хв виміряти оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння відносно своїх компенсаційних розчинів на спектрофотометрі за довжини хвилі 410 нм.

3.8 Розрахунок вмісту флавоноїдів у рослинній сировині. Вміст суми флавоноїдів (X, %) у сировині, в перерахунку на рутин і суху речовину, розрахувати за формулою:

$$X = \frac{100 \cdot m_0 \cdot A \cdot b}{5 \cdot A_0 \cdot m(100 - W)}, \quad (1.1)$$

де, m_0 – маса наважки рутину, в грамах;

m – маса наважки сировини, взятої для аналізу, в грамах;

A – оптична густина випробовуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину порівняння;

b – вміст дрібної фракції у подрібненому зразку досліджуваної сировини, у відсотках;

W – втрата в масі після висушування сировини, у відсотках.

У разі подрібнення зразків, що були заготовлені самостійно, вважаємо що в рослинній сировині 60-78 % дрібної фракції і 22-40 % грубої фракції. Для промислових зразків це співвідношення становить 40-44 % і 56-60 %, відповідно.

4. Обробка отриманих результатів. Результати дослідів, наведених у пунктах 2, занести у таблицю 1.3. На основі отриманих результатів та даних, наведених в таблиці 1.2, визначити, які саме групи флавоноїдів наявні в досліджуваній сировині.

За результатами, отриманими в пункті 3, розрахувати кількість флавоноїдів, у перерахунку на рутин, яка міститься в досліджуваній сировині. Порівняти отримані результати з літературними даними. У випадку виникнення розбіжностей, обґрунтувати їх причини.

На основі отриманих результатів кількісного та якісного аналізу зробити висновки.

Питання для самоконтролю

1. Що таке флавоноїди?
2. Які флавоноїди називаються істинними?
3. За яким принципом відбувається класифікація флавоноїдів? Назвіть їх основні класи.
4. В чому відмінність між флавоноїдами різних класів?
5. В яких рослинах містяться флавоноїди? Яких класів?
6. Як флавоноїди впливають на організм людини?
7. Як флавоноїди застосовуються у біотехнології і навіщо?

8. Яким чином виділяють флавоноїди з рослинної сировини? З яких її частин?
9. Як можна визначити наявність флавоноїдів в сировині?
10. Як визначають кількісний вміст флавоноїдів в рослинній сировині?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЦІЛЕЙ

Мета роботи: навчитися готувати поживні середовища для культивування різних видів продуцентів.

Матеріали та обладнання: ваги, плитка електрична, мішалка магнітна, термopapa, рН-метр, колби, марні циліндри, шпателі, скляні палички, кастрюлі, ватно-марлеві пробки, папір для автоклавування, маркери, марля, фільтрувальний папір, секундомір.

Реактиви: агар мікробіологічний, м'ясо, натрію хлорид, пептону, нітрату натрію, калію гідрофосфат, магнію сульфат, калію хлориду, феруму сульфат, глюкоза, лактоза, фуксин основний, натрію сульфат, діамонійфосфат, сульфат мангану, дріжджовий екстракт, натрію ацетат.

Теоретичні відомості

Живлення є важливою функцією мікроорганізмів. Воно необхідне для їх росту і розмноження. Для культивування мікроорганізмів застосовують різні поживні середовища, які повинні містити у своєму складі усі необхідні поживні речовини, ростові фактори, мікро та макроеlementи, мати відповідну реакцію середовища та бути стерильними.

Поживні середовища **за складом** ділять на натуральні, синтетичні та напівсинтетичні.

Натуральні середовища складаються з продуктів рослинного та тваринного походження. Це овочеві або фруктові соки, молоко, картопля або відвари та екстракти, отримані з природних субстратів. Прикладом натуральних середовищ є м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) та м'ясопептонний агар (МПА), неохмелене пивне сусло, дріжджове середовище, ґрунтова витяжка та інші.

Синтетичні середовища готують з певних хімічно чистих сполук у точно вказаних концентраціях. Переваги синтетичних середовищ полягають у тому, що

їх можна точно повторити. Прикладом синтетичних середовищ є середовище Чапека для цвільових грибів та актиноміцетів, середовище Ешбі для азотофіксуючих мікроорганізмів та інші.

Напівсинтетичні середовища поряд зі сполуками відомого складу (вуглеводи, фосфати, нітрати) вміщують у себе речовини невизначеного складу, такі як м'ясний відвар, дріжджовий екстракт тощо.

За **призначенням** середовища поділяють на універсальні та спеціальні.

Універсальні або **загальнозживані** середовища призначені для вирощування широкого кола мікроорганізмів. Це МПА, МПБ.

Спеціальні середовища призначені для виявлення тих чи інших біохімічних особливостей мікроорганізмів або для отримання культур мікроорганізмів, які мають особливі властивості. Серед спеціальних середовищ розрізняють елективні (вибіркові) та диференційно-діагностичні (індикаторні) середовища.

Елективні середовища забезпечують найбільш сприятливі умови для вирощування певних мікроорганізмів. Це середовище Чапека (для цвільових грибів та актиноміцетів), середовище Врублевського, Кітт-Тароцці (для анаеробів), МПА з новобіоцином для сапрофітних стафілококів, стійких до новобіоцину, та інші.

Диференційно-діагностичні середовища (індикаторні) дають змогу швидко відрізнити (диференціювати) один вид мікроорганізмів від інших. Часто з цією метою до складу середовища вводять спеціальні барвники-індикатори, які забарвлюють колонії виявлених мікроорганізмів у певний колір. Наприклад, середовище Ендо (селективне для бактерій групи кишкової палички).

За **консистенцією** середовища поділяються на рідкі, щільні та сипучі.

Рідкі середовища використовують для вивчення продуктів обміну мікроорганізмів, для виявлення їх фізіолого-біохімічних особливостей, накопичення біомаси.

Щільні середовища використовують для отримання чистої культури мікроорганізмів, для зберігання культур, для визначення ряду властивостей мікроорганізмів. Щільні поживні середовища готують з рідких шляхом

додавання до них агар-агару; желатину, гелю кремнекислого або поліакриламідного гелю.

Агар-агар – складний полісахарид, отриманий з бурих або червоних водоростей. Він утворює гель з точкою плавлення 96-100 °С та температурою застигання близько 40 °С. Як поживне середовище використовується небагатьма мікроорганізмами, тому є найкращою гелеутворюючою речовиною.

Желатин – речовина білкової природи. Як ущільнювач середовищ. використовується обмежено, бо розріджується за 23-25 °С та застигає за 20 °С. У більшості випадків використовується для виявлення протеолітичної активності.

Сипучі середовища іноді використовують у промисловій мікробіології. До таких середовищ відносять розварене пшона, висівки, просочені поживним розчином.

Поживні середовища відразу ж після приготування розливають у посуд та піддають стерилізації, режим та спосіб якої визначають складом та консистенцією середовищ. Більш детально способи стерилізації різних поживних середовищ наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Способи стерилізації поживних середовищ

Середовища	Метод стерилізації	Режим стерилізації
Поживне середовище з ґрунтовою витяжкою, картопляне середовище	Автоклавування	147-196 кПа (1,5-2 атм), 30 хв
Рідке та агаризоване середовище, яке не містить вуглеводів та інших речовин, що розкладаються за 120 °С	Автоклавування	98 кПа (1 атм), 20 хв
Рідке та агаризоване середовище, яке містить вуглеводи та інших речовин, що розкладаються за 120 °С	Автоклавування	49 кПа (0,5 атм), 20-30 хв

Середовище або компоненти середовища, які не витримують нагрівання вище 100 °С	Дробна стерилізація	Текуча пара 3 рази по 30-40 хв, через добу
Середовище або компоненти, які не витримують нагрівання, наприклад білки, деякі вітаміни та інші	Фільтрування через бактеріальні фільтри	-

Середовища, стерилізовані за надлишкового тиску 0,5 атм, розливають у попередньо простерилізований за 1,5 атм посуд.

Перед стерилізацією до кожної посудини із середовищем прикріплюють лист паперу з зазначенням назви середовища та часу його приготування. Зберігають поживні середовища у прохолодному, захищеному від світла та вологі місці не більше 1-1,5 тижнів.

Хід роботи

1 Приготування натурального середовища м'ясопептонного агару (МПА), який використовується для кількісного обліку мікроорганізмів і виділення їх в чисту культуру.

МПА готують на основі м'ясопептонного бульйону (МПБ). Для його приготування потрібно 500 г свіжого дрібно порубаного або розмеленого м'яса залити 1 л води, нагріти до 50 °С і витримати 60 хв за цієї самої температури або 12 год в холодному місці. Екстракт профільтрути через полотно або марлю і прокип'ятити 30 хв. Потім додати 5 г NaCl (хлориду натрію) і 10 г пептону (суміш продуктів неповного гідролізу білків). Фільтрути в гарячому стані через подвійний паперовий фільтр. Фільтрат довести водою до початкового об'єму (1 л) і визначити рН (стандартне значення 7,2-7,6). До м'ясопептонного бульйону додати мікробіологічний агар в кількості 15-20 г.

Готове середовище автоклавати та в гарячому вигляді розлити в необхідні ємності (пробірки, чашки Петрі, інше) для подальшого культивування мікроорганізмів та охолодити до температури біосинтезу.

2 Приготування синтетичного елективного середовища Чапека.

Використовується для вирощування цвільових грибів та актиноміцетів. Відноситься до синтетичних середовищ. Як джерело вуглецю можна використовувати глюкозу або крохмаль, останній зазвичай застосовують у приготуванні рідкого середовища Чапека.

Для приготування середовища на вагах зважити необхідні солі в кількості: NaNO_3 (нітрату натрію) – 2,0 г, K_2HPO_4 (гідрофосфату калію) – 1,0 г, MgSO_4 (сульфату магнію) – 0,5 г, KCl (хлориду калію) – 0,5 г, FeSO_4 (сульфату феруму) – 0,1 г. Солі змішати в колбі та додати 30,0 г глюкози. Всі інгредієнти розчинити в 1 л дистильованої води. Потім середовище профільтрувати через подвійний паперовий фільтр та додати 20,0 г агар-агару. Перед стерилізацією виміряти рН поживного середовища (воно повинно становити 4,7).

Далі простерилізувати поживне середовище в автоклаві 30 хв за 120 °C в колбах. Готове середовище розлити в ємності (пробірки, чашки Петрі, інше) для проведення культивування та охолодити до температури ферментації.

3 Приготування диференціально-діагностичного середовища Ендо.

Використовується для виділення та диференціації ентеробактерій за здатністю ферментувати лактозу.

На вагах зважити необхідні для приготування середовища речовини: пептон – 10,0 г; лактоза – 10 г; фуксин основний – 0,5 г; Na_2SO_3 (сульфіт натрію) – 1,0 г; K_2HPO_4 (гідрофосфат калію) – 0,5 г. Всі інгредієнти розчинити в 1 л дистильованої води. Потім середовище профільтрувати через подвійний паперовий фільтр та додати та 15,0 г агар-агару. Перед стерилізацією виміряти рН поживного середовища.

Далі простерилізувати поживне середовище в автоклаві 30 хв за 120 °C в колбах. Готове середовище розлити в ємності (пробірки, чашки Петрі, інше) для проведення культивування та охолодити до температури ферментації.

Застигле середовище підсушити у термостаті.

4 Приготування натурального мелясного середовища. Для культивування дріжджів та ряду інших бактеріальних продуцентів глибинним способом використовують мелясне сусло.

100 г густої меляси змішати з водою в співвідношенні 1:3, нагріти до 95 °С і дати відстоятися 2 год. При цьому осідають коагульовані колоїди і мелясний розчин освітлюється. Освітлене середовище профільтрувати через подвійний паперовий фільтр для відділення домішок. До розчину додати 3% диамонійфосфату, розбавити водою до 5-8% сухих речовин (довести отриманий розчин водою до 1 л).

Готове середовище простерилізувати за надлишкового тиску 0,05 МПа 30 хв в автоклаві. Після стерилізації середовище розлити в ємності для культивування (конічні колби, інше) та охолодити до температури ферментації.

5 Приготування диференціального середовища Сабуро, яке має широкий спектр застосування в мікробіології: використовується для аналізу клінічного матеріалу, при проведенні санітарно-мікробіологічного дослідження приміщень, а також для виявлення мікроорганізмів та грибів у косметичних засобах та продуктах харчування.

Для цього на вагах зважити необхідні для приготування середовища речовини: пептон – 10,0 г; глюкоза – 40 г. Всі інгредієнти розчинити в 1 л дистильованої води. Потім середовище профільтрувати через подвійний паперовий фільтр та додати та 15,0 г агар-агару. Перед стерилізацією виміряти рН поживного середовища.

Далі простерилізувати поживне середовище в автоклаві. Готове середовище розлити в ємності (пробірки, чашки Петрі, інше) для проведення культивування та охолодити до температури біосинтезу.

6 Приготування напівсинтетичного середовища МРС. Склад агару МРС розробили де Ман, Рогосса і Шарп (de Man, Rogossa and Sharpe) для отримання середовища, здатного підтримувати гарне зростання лактобацил взагалі і, зокрема, таких штамів, які погано ростуть на звичайних середовищах, наприклад, *L. brevis* і *L. fermenti*. Також дає рясне зростання лактобактерій з молочних продуктів та інших харчових продуктів.

Для приготування середовища використовувати, з розрахунку на 1 л готового поживного середовища: 50 %-ий розчин глюкози – 40 мл, пептон – 10,0 г; м'ясну воду – 100 мл (готувати так само, як і для середовища МПА),

дріжджовий екстракт – 10,0 г; ацетат натрію – 5,0 г; MgSO_4 (сульфат магнію) – 0,2 г; MnSO_4 (сульфат мангану) - 0,05 г. Довестидистильованою водою до 1 л. Перемішати.

Готове середовище стерилізувати за надлишкового тиску 0,05 МПа 30 хв в автоклаві. Після стерилізації середовище розлити в ємності для культивування (конічні колби, інше) та охолодити до температури біосинтезу.

7 Обробка результатів. ~~Н-обробці результатів~~ Описати і отримане студентами середовище (фізичні властивості: колір, агрегатний стан, в'язкість, тощо) до автоклавування та після. Вказати отримані значення рН. Порівняти отримані дані з літературними даними по характеристиках кожного з середовищ. Надати відомості у висновках, для культивування яких мікроорганізмів використовується приготоване поживне середовища та чому середовище має саме такий склад.

Питання для самоконтролю

1. Що таке поживне середовище. Які компоненти повинні входити до його складу?
2. За якими принципами класифікуються поживні середовища?
3. Які середовища називають натуральними?
4. Що таке синтетичні та напівсинтетичні поживні середовища?
5. Які середовища називаються універсальними? Наведіть приклади.
6. Що таке спеціальні поживні середовища? Які вони бувають?
7. В чому особливості діагностичних поживних середовищ?
8. Як бувають середовища залежно від консистенції?
9. Що використовують як згущувачі для поживних середовищ?
10. Назвіть основні способи стерилізації поживних середовищ. В яких випадках використовується кожен із них?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ВОДИ, ПОВІТРЯ, ОБЛАДНАННЯ ТА ПЕРСОНАЛУ ЛАБОРАТОРІЇ

Мета роботи: Ознайомитися із основними методами мікробіологічного контролю виробництва, провести аналіз мікробіологічної чистоти води, повітря, обладнання та санітарного стану рук.

Матеріали та обладнання: термостат, спиртові пальники, стерильний посуд (чашки Петрі, піпетки, пробірки, шпателі Дригальського, петлі мікробіологічні, ватні тампони), груші, лупа, маркер, мікроскоп, предметні та покривні скельця, пінцет.

Реактиви: середовища МПА, Ендо, Сабуро, вода стерильна, набір реактивів для фарбування по Граму.

Теоретичні відомості

Санітарні умови виробництва в біотехнологічній промисловості визначають якість, а у певних випадках й придатність та безпечність продукції. Мікробіологічний контроль на різних етапах виробничого процесу дає змогу відслідкувати санітарний стан виробництва та, за потреби, коригувати заходи з підтримання належного рівня чистоти. Очевидно, що у виробництвах, на яких відбувається випуск продукції медичного призначення, значення мікробіологічного контролю важко переоцінити, адже створення асептичних умов вимагає постійного контролю всіх об'єктів, що контактують з продукцією.

Основними об'єктами мікробіологічного контролю на підприємствах галузі є повітря приміщень, вода, лабораторні та виробничі поверхні, прилади та обладнання.

Повітря виробничих приміщень може стати джерелом мікробного забруднення сировини, напівфабрикатів та готової продукції. Це може призвести до погіршення їх якості, зниження нормативних термінів зберігання, а також викликати захворювання людей. Для визначення кількості мікроорганізмів у

повітрі використовують методи, в основу яких покладені принципи зсідання (седиментації) та засмоктування (аспірації).

Аспіраційний метод базується на використанні апарата конструкції Ю. А. Кротова. Схему подано на рисунку 3.1.

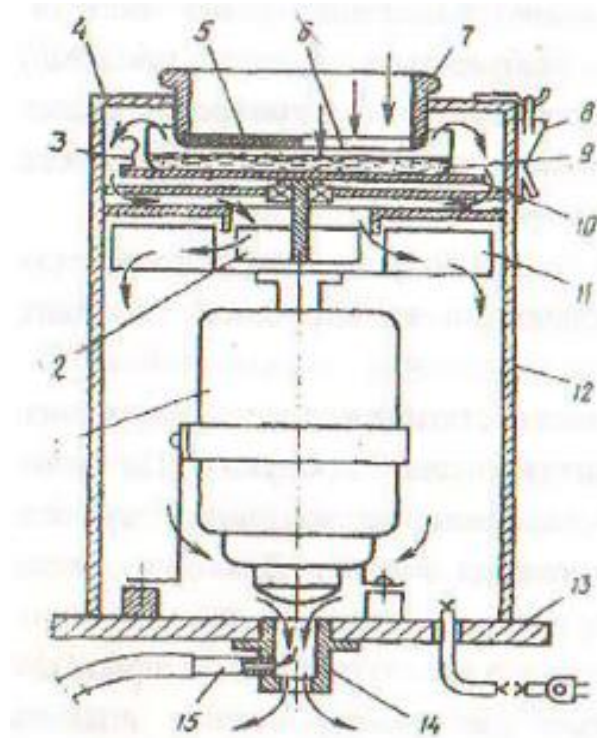


Рисунок 2.1. Схема апарату Ю. А. Кротова:

1 – електромотор; 2 – крильчатка; 3 – пружина; 4 – кришка приладу; 5 – диск з плексигласу; 6 – клиноподібний вузький отвір; 7 – розрізне кільце; 8 – накидні замки; 9 – чашка Петрі; 10 – диск; 11 – центробіжний вентилятор; 12 – циліндр; 13 – дно циліндру; 14 – штуцер з діафрагмою; 15 – вивідна трубка (до ротаметру).

Вентилятор обертається з частотою 4000-5000 об/хв, енергійно засмоктуючи повітря, що надходить через вузький клиноподібний отвір апарату та вдаряє по поверхні поживного середовища у чашці Петрі. Обтікаючи електродвигун, повітря виходить з приладу через ротаметр, що градуйований у л/хв. Для рівномірного розподілу мікроорганізмів до поверхні середовища диск з чашкою обертається з частотою 60-100 об/хв. Впродовж 1 хв через апарат проходить 25-50 м³ повітря. Для визначення загального мікробного забруднення

апарат включають на 1-3 хв, для встановлення санітарного стану та виявлення патогенних мікроорганізмів – на 3-15 хв. Потім кришку апарату знімають, засіяну чашку виймають, закривають та вміщують у термостат на 24 год за 37 °С, після чого витримують за кімнатної температури ще 48 год та підраховують кількість колоній, що вирости на чашці. За швидкістю та тривалістю просмоктування повітря через апарат визначають загальний об'єм, з якого проводили засів, та розраховують вміст мікроорганізмів в 1 м³ повітря.

Повітря виробничих приміщень вважається чистим, якщо воно містить не більше ніж 500 мікроорганізмів в 1 м³.

Більш тонкі (та точні) методи визначення мікробного забруднення повітря базуються на використанні фільтрів з різних матеріалів та подальшого аналізу і підрахунку затриманих мікроорганізмів.

Так, використовуючи мембранні фільтри, можливо концентрувати на них вміст великих об'ємів повітря. Фільтри Петрянова (на основі полімерних матеріалів) використовують для якісного та кількісного експрес-аналізу мікрофлори повітря: відбирають повітря, підрощують клітини впродовж 5-6 год (накладаючи фільтр на поверхню агаризованого середовища) після чого проводять пофарбування мікроколоній на фільтрах.

Питна вода, що використовується на підприємствах біотехнологічної промисловості, повинна відповідати вимогам санітарних норм і правил (СНіП). Один раз на квартал у разі використання міського водопроводу і один раз на місяць за наявності власних джерел водопостачання (артезіанська свердловина тощо) у воді визначають: загальну кількість бактерій, кількість бактерій групи кишкової палички та наявність патогенних мікроорганізмів (збудників черевного тифу, холери, дизентерії). Останній аналіз виконується лабораторіями санітарної інспекції.

Норми вісту мікроорганізмів у питній воді (за СНіП). Санітарно-гігієнічну оцінку якості води проводять на підставі показників колі-індекс та колі-титр. **Колі-індекс** виражає кількість клітин кишкової палички в 1000 см³ води, а колі-титр – найменший об'єм, що містить одну кишкову паличку.

За чинними стандартами питна вода має відповідати таким показникам:

- колі-титр – не менше 300 см³;
- колі-індекс – не більше 3 клітин;
- загальна кількість бактерій в 1 см³ води – не більше 100 клітин;
- не містить патогенних мікроорганізмів.

Виробничі приміщення та обладнання. Для запобігання забруднення сторонніми мікроорганізмами сировини і напівфабрикатів у процесі їх переробки і готової продукції під час зберігання необхідною умовою є підтримання чистоти на робочому місці, у виробничих приміщеннях, санітарна обробка обладнання, інвентарю, тари.

Після санітарної обробки проводять санітарно-гігієнічний контроль якості миття та дезінфекції обладнання, інвентарю, тари, який включає визначення загальної бактеріального обсіменіння змивів з технологічного устаткування. Змиви беруть за допомогою стерильних нержавіючих металевих трафаретів з вирізаною серединою (площа вирізу 10, 25 або 100 см²). Цю площу протирають стерильним ватним тампоном, змоченим у стерильній воді у пробірці на 10 мл, після чого тампон занурюють в цю пробірку, ретельно перемішують вміст і висівають 1 мл змиву на м'ясо-пептони агар. Після термостатування посівів за 37 °C протягом 24-48 год визначають загальну бактеріальну забрудненість у перерахунку на 1 см² досліджуваної поверхні.

У змивах з добре вимитого обладнання загальна кількість мікроорганізмів і колі-індекс не повинні перевищувати їх вмісту в чистій воді, що надходить на мийку.

Контроль якості миття та дезінфекції трубопроводів, рукавів, шлангів подібним чином здійснити не можна, оскільки з їх внутрішньої поверхні важко зробити змиви за допомогою трафарету. У цьому випадку загальна кількість мікроорганізмів і колі-індекс визначають в останній промивній воді шляхом її мікроскопіювання та посіву. Загальна бактеріальна забрудненість та колі-індекс промивної води не повинні відрізнятися від показників води, застосовуваної у виробництві.

Для контролю якості миття та дезінфекції інвентарю проби відбирають у той момент, коли інвентар підготовлений до роботи. З дрібного інвентарю

(мішалки, пробники, термометри, ножі, шприци тощо) мазки беруть стерильним тампоном зі всієї поверхні предмета і досліджують на загальну кількість мікроорганізмів і на наявність кишкової палички. Зі столів, стелажів, лотків, відер, лопат і т. ін. мазки беруть стерильним тампоном за допомогою обпаленого у полум'ї трафарету і роблять аналогічні аналізи.

Для контролю якості миття та дезінфекції тари (бочки, бідони, цистерни) проби останньої промивної води мікроскопіюють або висівають на щільні поживні середовища. Загальна кількість мікроорганізмів в 1 мл та колі-індекс не повинні значно відрізнятись від обсіменіння води, застосовуваної у виробництві.

Контроль чистоти рук та одягу персоналу. У разі недотримання особистої гігієни (чистоти рук, спецодягу), особливо під час ручних операцій, на харчові продукти можуть потрапляти мікроорганізми, в тому числі і патогенні.

Бактеріальну забрудненість рук та одягу визначають шляхом дослідження мікрофлори змивів. У змивах, які беруть перед початком роботи, зазвичай визначають загальну бактеріальну забрудненість та наявність кишкової палички. Чистоту рук оцінюють за кількістю мікроорганізмів в 1 мл змиву. Наявність бактерій групи кишкової палички у змивах з рук та одягу не допускається. Контроль за дотриманням правил особистої та виробничої гігієни здійснюється працівниками санітарного нагляду та санітарними постами.

Хід роботи

1 Розлити поживні середовища у чашки Петрі для визначення мікробного забруднення повітря, води та рук.

1.1 Підготовка стерильного середовища до розливу і чашки Петрі. Агаризоване поживне середовище перед розливом розплавити на водяній бані та охолодити до температури 45-50 °С.

1.2 Розлив стерильного середовища в чашки Петрі. Розлив середовища проводити в асептичних умовах. Встановити в зоні полум'я чашку Петрі, в яку буде розливатися середовище. Колбу з середовищем взяти у праву руку та, тримаючи її біля вогню, лівою рукою виїняти пробку (та тримати її мізинцем)

або перенести її та тримати мізинцем правої руки. Обпалити горловину колби та, трохи відкривши лівою рукою кришку чашки, внести в неї горловину колби, не торкаючись чашки.

В чашку налити 20-25 см³ середовища (шаром 4-5 мм), розподіляючи середовище рівномірно по дну чашки. Якщо на поверхні середовища утворюються пухирці повітря, чашку закрити та злегка похитати у горизонтальній площині. Після цього чашку встановити на горизонтальну поверхню та лишити на 10-15 хв для застигання середовища.

Якщо необхідно внесення точної кількості середовища у чашку Петрі, можливий також інший спосіб розливу. Тоді розлив проводять удвох: одна людина відкриває по чергово колбу з середовищем та чашки Петрі, інша піпеткою набирає середовище та вносить у чашки.

1.3 Витримування агаризованого поживного середовища перед використанням. Перед засівом чашки із застиглим середовищем витримати 24-72 год у термостаті за 37 °С. За цей час висихає конденсат, що утворюється в чашках, а також перевіряється стерильність середовища в чашках (дотримання умов асептики під час розливу середовища). Для подальшої роботи використовують лише чашки, на яких відсутні ознаки росту мікроорганізмів (мікробного забруднення).

В роботі використовують такі поживні середовища:

- м'ясо-пептонний агар (МПА) (г/дм³): пептону – 10, хлориду натрію – 5, агару – 20, м'ясна вода до 1 л; рН 7,2-7,4. МПА є стандартне загальноживане поживне середовище для вирощування більшості мікроорганізмів;
- середовище Ендо (г/дм³): рибний гідролізат (або пептон) – 10,0; агар – 15,0; цукор молочний – 10,0; фуксин основний – 0,5; натрій фосфорнокислий двозаміщений – 0,5; натрію сульфід – 1,0; натрій вуглекислий – 0,01; вода до 1 дм³; рН 7,3. Середовище Ендо – диференційне середовище, на якому здатні рости лише мікроорганізми групи кишкової палички;

- середовище Сабуро (г/дм³): пептон – 10,0; глюкоза – 40,0; агар-агар – 15,0; вода до 1 дм³; рН 5,6. Середовище Сабуро – середовище, яке використовують з метою встановлення і виділення дріжджів, цвілі та інших патогенних грибів.

2 Визначення мікробного забруднення повітря приміщень седиментаційним методом.

2.1 Підготовка до забору проб повітря. Для кожного визначення використовують 1-2 чашки з 20-25 см³ агаризованого поживного середовища МПА та Сабуро та Ендо. Чашки перенести у досліджуване приміщення та розмістити на розгорнутий папір, в якому вони стерилізувалися. Не перегортаючи, зсунути кришки на самий край стінки чашки, щоб вся поверхня середовища була відкрита повністю.

2.2 Витримування експозиції відбору повітря. Чашки залишити відкритими 5-15 хв (час експозиції) залежно від передбачуваної забрудненості приміщення. Час експозиції зафіксувати в протоколі.

2.3 Вирощування чашок Петрі з пробами повітря. Після цього їх закривати кришками, перегорнути догори дном та помістити у термостат на 24-48 год за температури 37 °С.

2.4 Визначення кількості колоній, що вирости на поверхні чашки Петрі. Після цього провести підрахунок колоній – візуально та за допомогою лупи.

2.5 Розрахунок кількості колоній мікроорганізмів в одиниці об'єму досліджуваного повітря. Для розрахунку кількості колоній в одиниці об'єму повітря користуються формулою, запропонованою В. Л. Омелянським, згідно з якою на поверхню чашки у 100 см² зсідає впродовж 5 хв стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься у 10 дм³ повітря.

Кількість мікроорганізмів в 1 м³ повітря:

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100}{b \cdot T}, \text{ кг/м}^3, \quad (3.1)$$

де a – число колоній, що вирости на чашці Петрі (середнє арифметичне);

b – площа чашки Петрі, см²;

T – час експозиції, хв;

100 – перерахунок площі чашки на 100 см².

5 – час експозиції чашки за Омелянським, хв;

100 – перерахунок на 1 м².

3 Мікробіологічний контроль води.

3.1 Відбір проб води. Готуючись до лабораторного заняття відібрати у видану стерильну пробірку зразок води (за бажанням – з крану, відкритого водоймища, артезіанської свердловини тощо) для аналізу.

Для відбору води з крану або спускової труби (комунікацій, обладнання) використовують стерильні пляшки по 0,25, 0,5 або 1 дм³, закриті ватно-марлевими пробками та паперовими ковпачками (або стерильні пробірки з ватно-марлевими пробками). Кран або край труби обпалити полум'ям, спустити впродовж 10-15 хв воду, після чого відібрати пробу води, намагаючись не замочити пробку, та закрити пляшку (чи пробірку).

У відкритих водоймищах пробу відібрати з певної глибини, використовуючи пристрій (батометр), що дає змогу відкрити та закрити пляшку на встановленій глибині. Зберігати проби води потрібно за температури не вище 5°C та досліджувати не пізніше, ніж через 6 год після відбору проби.

3.2 Розведення проб води. Перед висіванням відібраної проби води на чашки Петрі, провести їх розведення. Для отримання розведення 1:10 в стерильну пробірку відібрати 1 мл досліджуваної води та 9 мл стерильної води. Добре перемішати. За необхідності отримання розведення 1:100 операцію повторити, тільки 1 мл відібрати з пробірки з розведенням 1:10. І далі так само.

Для приготування кожного розведення використовують окрему стерильну піпетку. Під час внесення води у наступну пробірку піпетка не повинна торкатися води.

Ступінь розведення залежить від концентрації мікроорганізмів в досліджуваній пробі. Наприклад, воду з крану можна не розводити взагалі, або розводити лише в 10 разів, а от воду з відкритої водойми потрібно розводити в 100, а то й більше разів.

3.3 Засівання чашок Петрі. Для дослідження загальної кількості мікроорганізмів по 0,1 см³ проби води, розведеної залежно від передбачуваного забруднення, піпеткою в асептичних умовах засіяти на 2 чашки Петрі з МПА та середовищем Ендо та розтерти шпателем. Роботу провести в зоні полум'я пальника для забезпечення стерильних умов.

У разі дослідження одного зразка води висіяти не менше двох послідовних розведень у двох повторностях: для питної води – без розведення та розведення у 10 разів; для проби води з відкритих водоймищ – розведення у 10 та 100 разів. Розведення готувати таким чином, щоб після пророщування у чашці було від 30 до 300 колоній.

3.4 Вирощування чашок Петрі з пробами води. Засіяні чашки перегорнути догори дном та розмістити у термостат за температури 37 °C на 24-48 год.

3.5 Визначення кількості колоній, що вирости на поверхні чашки Петрі. Після вирощування в термостаті підрахувати всі колонії, що вирости. За наявності більше 300 колоній на чашці дозволено підрахунок на 1/4 площі чашки. На підставі підрахунків, використаного розведення зразку та кількості зразків, внесеного у чашку розрахувати кількість бактерій у одиниці об'єму досліджуваного зразка води. Зробити висновок про відповідність якості води за даним показником норми та занести дані у підсумкову таблицю.

3.6 Визначення кількості бактерій групи кишкової палички. До бактерій групи кишкової палички відносять три роди *Escherichia*, *Citobacter*, *Enterobacter*, що належать до родини *Enterobacteriaceae*.

Бактерії групи кишкової палички – це грамнегативні аспорогенні палички, що ростуть на середовищі Ендо з утворенням червоних з металевим блиском, темно-червоних та рожевих з темним центром, а також прозорих незабарвлених колоній. Розмір бактерій 0,5×(1-2) мкм, більшість рухливі, ростуть в широкому діапазоні температур з оптимумом за 37 °C, аероби або факультативні аероби. На МПА через добу утворюють прозорі з сіро-блакитним відливом колонії, з розпливчастими або хвилястими краями.

За наявності у чашках з середовищем Ендо типових колоній їх досліджують під мікроскопом: готують мазки та забарвлюють їх за Грамом. Наявність у мазку грамнегативних, коротких, аспорогенних паличок вказує на переважне відношення мікроорганізму до досліджуваної групи бактерій.

4 Мікробіологічний контроль чистоти рук. Чистоту рук перевіряють перед початком виробничого процесу у робітників, що мають безпосередній контакт з продукцією або асептичним процесом або безпосередньо під час процесу. Контроль проводять без попереднього попередження.

4.1 Приготування зразку змиву з рук. З чашки Петрі за допомогою пінцету взяти стерильний вологий ватний тампон та протерти їм долоні, тильну сторону долоні, між пальцями. Тампон занурити у пробірку зі стерильною водою, добре перемішати, залишити на 5 хв та використати для приготування 10-ти кратного розведення вищеописаним способом.

4.2 Засівання чашок Петрі. Для визначення концентрації мікроорганізмів в змиві провести посів $0,1 \text{ см}^3$ розведення на МПА та Ендо. Останнє використовується для визначення бактерій групи кишкової палички.

4.3 Вирощування чашок Петрі з пробами змивів з рук. Після засівання чашки Петрі помістити в термостат за 37°C , де витримувати впродовж 48 годин.

4.4 Визначення чистоти рук. Чистоту рук оцінити за кількістю мікроорганізмів у 1 см^3 змиву за відсутності кишкових паличок відповідно до даних наведених у таблиці 3.1. Для цього попередньо провести підрахунок колоній, які вирости на чашках Петрі. Зробити перерахунок на кількість колоній в 1 см^3 зливу, з урахуванням розведення.

5 Мікробіологічний контроль чистоти поверхонь та приладів (обладнання). Чистоту поверхонь та приладів перевіряють після проведення підготовчих процесів, а саме прибирання приміщень й миття та стерилізації обладнання. Мікробіологічний контроль чистоти поверхонь та приладів проводять аналогічно контролю чистоти рук.

5.1 Приготування зразка змиву з поверхонь чи приладів. Закріплений на паличці стерильний тампон змочити стерильною водою та протерти їм зовнішню або внутрішню поверхню приладу. Тампон занурити у пробірку, в якій

він змочувався, добре перемішати та використати для приготування 10-ти та 100-кратного розведення вищеописаним способом.

Таблиця 3.1 – Оцінка санітарного стану чистоти змивів з рук.

Кількість мікроорганізмів в 1 см³ змиву з рук	Оцінка санітарного стану
1 000	Відмінно
1 000-5 000	Добре
5 000-10 000	Задовільно
більше 10 000	Погано

5.2 Засівання чашок Петрі. Для визначення загальної кількості мікроорганізмів у 1 см³ провести посів розведень (по 0,1 см³) на МПА. Для визначення бактерій групи кишкової палички, проби висіяти також на середовище Ендо.

5.3 Вирощування чашок Петрі з пробами змивів з рук. Після засівання чашки Петрі помістити в термостат за 37 °С, де витримувати впродовж 48 годин.

5.4 Визначення чистоти поверхонь та приладів. Після вирощування підрахувати кількість колоній в чашках Петрі та розрахувати кількість колоній в 1 см³ змиву з урахування розведення. Результати аналізу оцінити відповідно до призначення поверхні, обладнання (приладу) та місця його розташування – відповідно до вимог даного класу чистоти приміщення.

6 Фарбування по Граму. За наявності у чашках типових колоній бактерій групи кишкової палички їх досліджують під мікроскопом: готують мазки та забарвлюють їх по Граму. Наявність у мазку грамнегативних, коротких, аспорогенних паличок вказує на переважне відношення мікроорганізму до досліджуваної групи бактерій.

Приготовані на предметному склі мазки-препарати зафіксувати над полум'ям пальника, охолодити і забарвити у такій послідовності:

- на предметне скло нанести: піпеткою розчин генціанвіолету (робочий розчин 1) таким чином, щоб повністю закрити поверхню мазка.

Забарвлення проводити протягом 1 хвилини, після чого змити барвник струменем води;

- нанести на поверхню скла 2-3 см³ розчин Люголя і витримати протягом 1 хвилини, після чого змити барвник струменем води;
- притримуючи пінцетом, занурити предметне скло в стакан зі знебарвлюючим розчином етанол-ацетона 5-6 раз до зникнення фіолетового забарвлення крапель, що стікають. Ретельно промити скло водою;
- нанести на предметне скло розчин сафраніну (робочий розчин 2) та витримати протягом 30-45 секунд змити;
- після забарвлення препарат просушити на повітрі або фільтрувальним папером і переглянути під мікроскопом з імерсійною системою.

7. Обробка результатів. Розглянути результати посівів, підрахувати кількість колоній, що вирости на чашках Петрі, за потреби провести мікроскопічне дослідження окремих колоній, розрахувати кількісні показники зразків та зробити висновок щодо якості досліджуваних зразків.

Порівняти отримані результати з характеристикою приміщень біотехнологічних та фармацевтичних виробництв за класами чистоти для оцінки результатів аналізу повітря приміщень та обладнання. Порівняти отримані результати чистоти води з відповідними показниками ДСТУ.

Всі результати та висновки, отримані впродовж виконання лабораторної роботи, занести в підсумкову таблицю 3.2. На основі отриманих результатів зробити висновки.

Таблиця 3.2 – Результати аналізу мікробіологічної чистоти повітря, води, приміщень та персоналу лабораторії

Об'єкт контролю	Мікробіологічні показники, що визначали для даного об'єкту	Оцінка санітарного стану

Питання для самоконтролю

1. Поясніть значення та відмінність термінів асептика та стерильність.
2. Що розуміють під санітарними умовами виробництва?
3. Що підлягає мікробіологічному контролю на виробництві?
4. Який документи нормують показники якості санітарного стану води, повітря, обладнання, приміщень тощо?
5. Що включає мікробіологічний контроль повітря? Назвіть його основні способи.
6. У чому полягає методика Омелянського?
7. Яким чином проводять контроль води на виробництві? Правила відбору проб.
8. Що характеризують колі-індекс та колі-титр?
9. Які основні принцип проведення мікробіологічного контролю поверхонь, обладнання, персоналу?
10. Які поживні середовища використовують для мікробіологічного контролю виробництва?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ НАКОПИЧЕНОЇ БІОМАСИ ТА СИНТЕЗОВАНИХ МЕТАБОЛІТІВ ПІСЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ГЛИБИННИМ СПОСОБОМ

Мета роботи: Ознайомитися із глибинним способом культивування мікроорганізмів. Дослідити вплив основних компонентів поживних середовищ на біосинтетичні процеси, визначити основні показники розвитку мікробних популяцій.

Матеріали та обладнання: штатив з пробірками, скляні палички, промивалка, предметне скельце, піпетки, петлі мікробіологічні, колби на 100 мл., водяна баня, кювети, термостат, мікроскоп, ваги аналітичні, спектрофотометр, центрифуга лабораторна, шафа сушильна, бюретка, секундомір.

Реактиви: культура молочнокислих бактерій родини *Lactobacillus*, глюкоза, пептон, м'ясна вода, дріжджовий екстракт, ацетат натрію, сульфат магнію, сульфат мангану, фуксин, фероціанід, фенолфталеїн, гідроксид натрію, дистильована вода.

Теоретичні відомості

Вирощування мікроорганізмів на поживному середовищі називають **культивуванням** (від лат. cultus – вирощування), а розвинуті в результаті мікроорганізми – **культурою**. Культивування мікроорганізмів, що реалізується в процесі виробничого біосинтезу, є основною стадією промислового отримання біомаси або продуктів метаболізму клітин.

Для вирощування бактерій в лабораторних умовах, дослідження їх різноманітних властивостей, тривалого зберігання використовують живильні середовища. Вони повинні відповідати певним стандартам, створюючи оптимальні умови для росту, розмноження й життєдіяльності мікроорганізмів.

У першу чергу, бактерії потребують вуглецю, азоту та водню для побудови власних білків. Водень і кисень для клітин постачає вода. Джерелом азоту

виступають численні речовини, в основному, тваринного походження (м'ясо яловиче, риба, м'ясо-кісткова мука, казеїн), а також білкові гідролізати, пептиди, пептони. Середовища повинні мати певну в'язкість, густину. Залежно від консистенції середовища можуть бути рідкі, напіврідкі, щільні, і мають бути ізотонічними, прозорими й обов'язково стерильними.

Численні потреби мікроорганізмів зумовлюють велике розмаїття живильних середовищ, а для окремих видів бактерій існують спеціальні середовища. Частину їх готують у лабораторіях безпосередньо перед посівом, але з кожним роком з'являються все нові й нові середовища заводського виготовлення (сухі), які здатні задовільнити найвибагливіші потреби мікробіологів. Вони зберігаються тривалий час, мають стандартний склад.

Культивування можна проводити поверхневим або глибинним, періодичним і безперервним методами, в аеробних або анаеробних умовах. Спосіб культивування залежить від кінцевої мети культивування: накопичення біомаси або отримання окремого продукту життєдіяльності мікроорганізму (метаболіту).

Поверхневий біотехнологічний процес – у разі поверхневої ферментації біооб'єкт може рости на рідкому, твердому, сипучому або пастоподібному живильному середовищі. Зростання біооб'єкту відбувається на поверхні і в порах твердих частинок середовища. Процес культивування вимагає великих площ, також виникають труднощі у створенні асептичних умов, підтримці постійної температури у всьому ферментаційному середовищі і у відведенні тепла. Вихід продукту біосинтезу невеликий.

Глибинний біотехнологічний процес – даний метод більш досконалий, легко піддається механізації і є основним промисловим методом культивування або ферментації. Процес культивування здійснюється в рідкому поживному середовищі, в біореакторах об'ємом до 100 м³. Перед заповненням ферментер стерилізують гарячою парою під тиском. Потім заповнюють охолодженим живильним середовищем. Посівний матеріал вносять у кількості від 5 до 20 % від обсягу використовуваного середовища. Це робить процес високоефективним. Накопичується велика кількість цільового продукту.

Періодичний біотехнологічний процес досить простий і досить часто застосовується в промислових масштабах. Однак, його не можна вважати оптимальним. У разі періодичного процесу одноразово завантажують в реактор всі компоненти живильного середовища і посівний матеріал. Потім відбувається повний цикл ферментації. Таким чином, корекції умов біосинтезу під час ферментаційного циклу не виконується: немає ні постійної підтримки оптимального співвідношення джерел вуглецю, азоту, фосфору, ні додавання в потрібний момент попередників цільового продукту, ні збереження оптимального значення рН і т. ін. Все це позначається на продуктивності ферментації. Вихід цільового продукту зменшується.

Безперервний процес ферментації полягає в тому, що з реактора безперервно відбирають невеликі порції культуральної рідини і одночасно в нього ж вносять такий самий обсяг живильного середовища. Система виявляється проточною. Використання безперервного процесу доцільно, наприклад, в тому випадку, якщо цільовим продуктом є безпосередньо сама біомаса вирощуваного мікроорганізму.

Глибинний метод, завдяки своїм перевагам, широко використовується для отримання біомаси мікроорганізмів (пресовані хлібопекарські дріжджі, кормових дріжджів) і різних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів (органічні кислоти, ферменти, антибіотики, амінокислот). Перевага глибинного культивування полягає у тому, що цей спосіб не потребує великих площ і громіздкого обладнання, а об'єм ферментаторів можна збільшити за рахунок збільшення висоти. Перевагою є також простота обслуговування, можливість автоматизації, а головне, зручність видалення непошкодженого цільного продукту із культуральної рідини.

До основних показників, що контролюють в процесі виробничого біосинтезу належить:

- концентрація біомаси та її мікробіологічна чистота;
- рН культуральної рідини;
- динаміка споживання основних компонентів середовища;
- накопичення цільового продукту.

Біотехнологічні методи культивування біооб'єктів виконуються у спеціальному обладнанні, наприклад, у ферментерах вирощують бактерії і гриби для одержання антибіотиків, ферментів, органічних кислот, деяких вітамінів тощо.

У подібних ферментерах вирощують деякі клітини людини (бласти) для одержання білка-інтерферону, а також деякі види рослинних клітин. Однак, останні частіше вирощують у стаціонарних умовах на середовищі з ущільненою (наприклад, агаризованою) підкладкою у скляних або поліетиленових ємностях.

Lactobacillus – рід грампозитивних факультативно анаеробних бактерій. До них належить велика частина молочно-кислих бактерій, групи, названої так за те, що більшість її членів перетворюють лактозу і інші цукри на молочну кислоту. Деякі різновиди *Lactobacillus* використовують у промисловості для виробництва кефіру, йогурту, сиру, квашених овочів, маринадів та інших продуктів молочнокислого бродіння, наприклад у заготівлі силосу.

Концентрацію біомаси визначають ваговим або нефелометричним методом.

Визначення біомаси ваговим методом включає: відділення біомаси з точного об'єму культуральної рідини центрифугуванням, відмивання з подальшим центрифугуванням, кількісне перенесення біомаси у попередньо висушений і зважений бюкс та висушування до постійної маси у сушильній шафі. Даний метод досить тривалий, тому використовується для визначення біомаси наприкінці процесу або для визначення біомаси клітин (актиноміцети, міцеліальні гриби), що важко проводити іншими методами, наприклад, нефелометрично.

Нефелометричне визначення біомаси базується на вимірюванні інтенсивності світла, що проходить крізь суспензію клітин. Кількість світла, що розсіюється суспензією мікроорганізмів, пропорційна або їх концентрації, або їх середнім розмірам. Для культур, що утворюють рівномірну каламуть, характерна чітка залежність між кількістю розсіяного світла та числом клітин в 1 см³ культуральної рідини. Концентрація клітин може бути виражена або безпосередньо в одиницях оптичної густини, або за допомогою калібрувального

графіка залежності величини світлорозсіювання від вмісту сухої біомаси в одиниці об'єму. Калібрувальний графік будують, відбираючи проби культуральної рідини та визначаючи в них концентрацію біомаси одночасно ваговим і нефелометричним методом.

Цей принцип не справджується у випадку утворення мікроорганізмами плівок, міцелію або зернистого осаду.

Хід роботи

1 Глибинне вирощування культури молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus*. Для засіву використати рідке поживне середовище МРС, складу: глюкоза (50 % розчин) – 40 мл; та інші компоненти (г/дм³): пептон – 10; м'ясна вода – 100; дріжджовий екстракт – 10; ацетат натрію – 5; сульфат магнію (MgSO₄) – 0,2; сульфат мангану (MnSO₄) – 0,05; та культуру лактобацил (штам LB-3), вирощену на напівтвердому середовищі МРС.

Засів провести в асептичних умовах, вносячи мікробну суспензію у колбу з поживним середовищем у кількості 5 % від його об'єму (за потреби використовувати піпетку).

Засіяні колби помістити у термостат за 37 °С і вирощувати впродовж 48 годин. Колби з вирощеною культурою використовують для аналізу процесу росту молочнокислих бактерій та біосинтезу молочної кислоти.

2 Визначення морфології культури та мікробіологічної чистоти популяції. Для аналізу мікробіологічної чистоти популяції провести мікроскопіювання суспензії.

На предметне скельце петлею нанести краплю культуральної рідини; розтерти; підсушити; зафіксувати у полум'ї пальника, проводячи предметне скельце декілька раз крізь полум'я; фарбувати розчином фуксину (2 хвилини); змити водою; підсушити.

Готовий препарат розглянути з імерсією. Замальовати культуру, відмічаючи присутність або відсутність сторонньої мікрофлори, а також особливості морфології культури, вирощеної на рідкому поживному середовищі.

3 Визначення концентрації мікробної біомаси. Концентрацію біомаси визначити ваговим або нефелометричним методом.

3.1 Визначення концентрації біомаси ваговим методом. У дві центрифужні пробірки відібрати по 5 мл культуральної рідини та центрифугувати за 3000 об/хв впродовж 5 хв. Після центрифугування фугат злити в окремі пробірки, а до осаду додати 5 мл дистильованої води (в кожну пробірку) та знову центрифугувати (3000 об/хв впродовж 5 хв). Операцію повторити двічі.

Після відмивання біомасу (осад) кількісно перенести у попередньо висушений і зважений бюкс. Далі бюкси висушити до постійної маси у сушильній шафі за 105 °С. Висушені бюкси помістити в ексикатор, охолодити до кімнатної температури та зважити на аналітичних вагах. Різниця у значеннях бюксу з біомасою бактеріальних клітин двох послідовних зважувань – не більше, ніж декілька одиниць у четвертому знаку після коми.

На основі отриманих даних розрахувати загальну кількість біомаси, що виросла в колбі та в перерахунку на 1 мл культуральної рідини:

$$X = \frac{(A - B)1000}{V}, \quad (4.1)$$

де X – кількість сухої біомаси в г/л;

A – маса біксу з осадом в г;

B – маса біксу без осаду в г;

V – об'єм культуральної рідини, узятий для центрифугування в мл.

3.2. Визначення концентрації біомаси нефелометричним методом.

Пробу культуральної рідини перемішати, піпеткою внести у кювету об'ємом 5 мл та виміряти оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 540 нм.

Як контроль використати попередньо відібране перед культивуванням поживне середовища МРС. Для цього його внести в кювету та виміряти оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 540 нм.

Кількість біомаси молочнокислих бактерій визначити, як різницю між оптичною густиною для культуральної рідини та поживного середовища:

$$OG_{540} = OG_{KP} - OG_{ПС}, \quad (4.2)$$

де OG_{540} – кількість біомаси в культуральній рідині;

OG_{KP} – оптична густина культуральної рідини;

$OG_{ПС}$ – оптична густина поживного середовища.

Якщо мікробна суспензія дуже густа (показник оптичної густини більше 0,8) її розводять поживним середовищем, враховуючи розведення у розрахунку.

$$OG_{540} = (OG_{KP} - OG_{ПС}) \cdot P, \quad (4.3)$$

де P – ступінь розведення культуральної рідини.

4 Визначення концентрації вуглеводів у поживному середовищі та культуральній рідині. В пробірку внести 1 см³ досліджуваного розчину та додати 3 см³ розчину фероціаніду. Визначення провести у 2 повторностях. Пробірки витримати у киплячій водяній бані рівно 15 хвилин.

Якщо розчин знебарвлюється, то необхідно розвести досліджуваний розчин, тобто внести, наприклад, 0,5 см³ досліджуваного розчину та 0,5 см³ дистильованої води або 0,1 см³ досліджуваного розчину та 0,9 см³ дистильованої води. Таким чином, завжди потрібно вносити 1 см³ розведеного досліджуваного розчину.

Рівно через 15 хвилин пробірки охолодити проточною холодною водою та виміряти оптичну густина розчину за 400 нм в кюветі 2 мм. Концентрацію редукуючих речовин визначають за калібрувальним графіком, використовуючи як стандарт глюкозу в діапазоні концентрацій 20-150 мкг/см³.

5. Визначення концентрації молочної кислоти титриметричним методом. У колбу відібрати піпеткою 5 см³ фугату культуральної рідини (або культуральної рідини) додати 3-4 краплі фенолфталеїну та титрувати 0,1 н розчином гідроксиду натрію NaOH до зміни забарвлення на рожевий колір. Вміст молочної кислоти визначити за формулою:

$$C = \frac{V \cdot F}{5} \cdot 100, \% \quad (4.4)$$

де V – об'єм 0,1н NaOH, що використано на титрування, см³;

F – фактор лугу за молочною кислотою. Прийняти $F = 0,0075$ (тобто, 1 см³ 0,1 н NaOH відповідає 0,0075 % молочної кислоти).

6 Обробка результатів. До протоколу занести результати мікроскопічного аналізу молочнокислих бактерій, отриманих після виконання етапу два.

Визначені на етапах 3-5 показники використати для розрахунку параметрів процесів росту та накопичення цільового продукту, а саме:

- концентрація біомаси, визначена нефелометричним методом OG_{540} ;
- кількість біомаси, визначена ваговим методом X , мг;
- вміст вуглеводів – концентрацію вуглеводів у вихідному середовищі, S_0 та у культуральній рідині наприкінці вирощування, S ;
- економічний коефіцієнт, що розраховати за формулою:

$$Y = \frac{X - X_0}{S_0 - S}, \quad (4.5)$$

де X_0 – початкова кількість біомаси в культуральній рідині. Прийняти $X_0 = 0,05X$;

- продуктивність культури визначити за формулою:

$$\Pi = \frac{OG_{540}}{X}; \quad (4.6)$$

- середня швидкість росту культури розрахувати за формулою:

$$v = \frac{X - X_0}{t}, \quad (4.7)$$

де t – час росту культури в колбах.

Результати визначених та розрахованих показників занести у таблицю 4.1.
На основі отриманих результатів зробити висновки.

Таблиця 4.1. – Результати вимірювань та розрахунків отриманих у дослідженні глибинного культивування молочнокислих бактерій

Джерело вуглецю	S_0 , мг/см ³	S , мг/см ³	$S_{б.к}$, мг/см ³	Y	Π , мг/мг	v , мг/год	Мікробіоло- гічна чистота, морфологія культури

Питання для самоконтролю

1. Що таке біосинтез?
2. Що таке біологічний агент? Їх класифікація.
3. Що таке метаболіти? Які вони бувають?
4. Які бувають способи культивування мікроорганізмів?
5. Яке культивування називається поверхневим?
6. Що таке глибинне культивування?
7. У чому відмінність між безперервним та періодичним культивуванням?
8. Яким способом визначають кількість молочної кислоти в культуральній рідині?
9. У чому полягає ваговий метод визначення кількості накопиченої біомаси в процесі біосинтезу?
10. Що таке нефелометричний метод контролю кількості біомаси в культуральній рідині?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ В ДЕЗІНТЕГРОВАНІЙ КУЛЬТУРІ ПРОДУЦЕНТУ

Мета роботи: ознайомлення з основними прийомами спектрофотометричного аналізу нуклеїнових кислот.

Матеріали та обладнання: штатив з пробірками, скляні палички, піпетки, промивалка, мірний циліндр, лійки для фільтрування, кювети, водяна баня, центрифуга, ваги аналітичні, спектрофотометр, секундомір.

Реактиви: перхлорна кислота (HClO_4), дистильована вода, культуральна рідина, водні розчини ДНК та РНК (або у TE-буфері), буфер TE.

Теоретичні відомості

Нуклеїнові кислоти – складні високомолекулярні біополімери, мономерами яких є **нуклеотиди**. Уперше нуклеїнові кислоти (НК) виділив і описав швейцарський біохімік Фрідріх Мішер, який у 1869 р. вилучив із ядер клітин специфічну речовину і назвав її «нуклеїном» (від лат. *nucleus* — ядро).

Нуклеїнові кислоти – це інформаційний банк, у якому знаходяться усі відомості про склад, розвиток і функціонування живих систем. У них не тільки зберігається спадковий матеріал, він активно реалізується під час процесів синтезу, розвитку організму, поділу клітин та розмноження.

Нуклеїнові кислоти побудовані із ланок нуклеотидів, пов'язаних між собою фосфодиетерними зв'язками.

У свою чергу, **нуклеотид** складається з:

- залишків нітрогеновмісного гетероциклу (азотистої основи), пурину або піримідину (рис. 5.1);
- п'ятивуглецевого моносахариду (пентози), рибози або дезоксирибози, залежно від типу нуклеїнової кислоти;
- фосфатної кислоти.



Рисунок 5.1. Структурні формули азотистих основ у складі нуклеотидів.

Число нуклеотидів у складі однієї молекули нуклеїнової кислоти може сягати 200 млн. А відстань між азотистими основами нуклеотидів у складі полінуклеотиду становить 0,34 нм.

Азотиста основа та пентоза поєднуються за допомогою **N-β-глікозидного зв'язку** між першим атомом вуглецю цукру та першим атомом азоту у піримідиновій або дев'ятим – у пуриновій основі. Така сполука називається **нуклеозидом** – мономером первинної структури нуклеїнових кислот (тобто це нуклеотид без залишку фосфорної кислоти).

Фосфорна кислота приєднується до цукру **складноєфірним зв'язком** (кислота-спирт). В окремих важливих молекулах нуклеотидів (наприклад, у молекулі АТФ – аденозинтрифосфорної кислоти) у випадку декількох фосфорних залишків на одному положенні зв'язки між фосфатами є високоенергетичними фосфоангідридними (кислота-кислота).

На рисунках 5.2 та 5.3 представлено структурні формули вуглеводів (пентоз), що входять у склад нуклеотидів, та загальна структурна формула молекули нуклеотиду.

До природних нуклеїнових кислот належить **ДНК** і **РНК**, які виконують у всіх живих організмах роль зберігання, передачі і реалізації генетичної інформації.

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота, моносахаридом якої є дезоксирибоза.

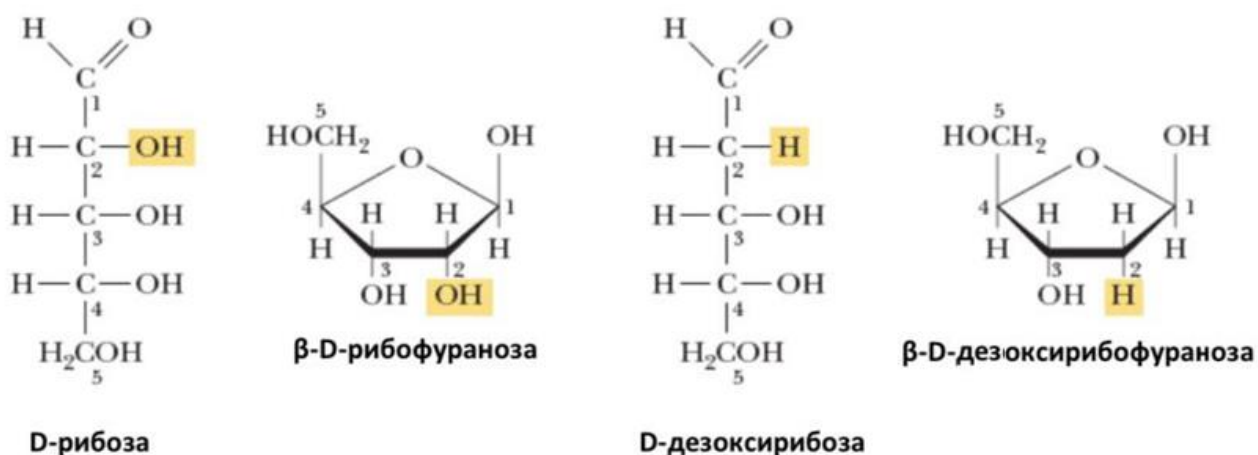


Рисунок 5.2. Структурні формули вуглеводів у складі нуклеотидів.

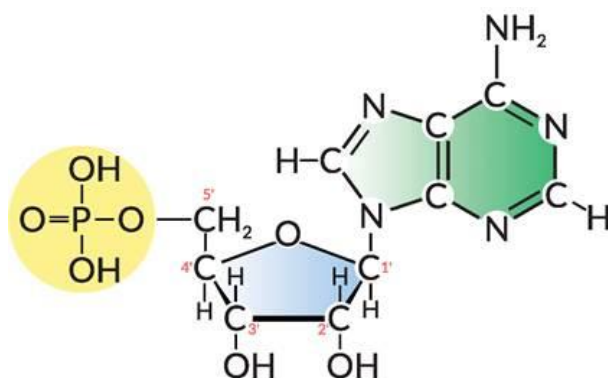


Рисунок 5.3. Розгорнута структурна формула молекули нуклеотиду.

До складу ДНК входять азотисті основи: пуринові – гуанін (G) і аденін (A) та піримідинові – тимін (T) і цитозин (C) (рис. 5.1, 5.4).

РНК – рибонуклеїнова кислота, у складі якої наявний моносахарид – рибоза. Структура полінуклеотидного ланцюга аналогічна такій у ДНК, проте, завдяки структурним стеричним особливостям рибози, РНК (матрична або інформаційна), як правило, одноланцюгова. Дволанцюгові РНК зустрічаються в генетичному матеріалі вірусів. Молекули транспортних та рибосомальних РНК утворюють дволанцюгові ділянки через комплементарні взаємодії всередині однієї молекули у різних вторинних і третинних структурах або з іншими молекулами. До складу молекул РНК входять азотисті основи: пуринові – гуанін (G), аденін (A) та піримідинові – урацил (U) і цитозин (C) (рис. 5.4), але є й міnorні форми – дігідроуридин, псевдоуридин та інші.

Класична дволанцюгова ДНК складається з двох полінуклеотидних ланцюжків, направлених антипаралельно (дуплекс). Існують також інші форми ДНК – триплекси, квадруплекси.

Для позначення послідовностей нуклеїнових кислот на письмі використовують однолітерні позначення нуклеотидів, додатковими позначками є У для піримідину та R – для пурину. Фосфатні групи позначаються як Р.

Таким чином, одноланцюгова молекула нуклеїнової кислоти починає записуватись з 5'-кінця, наприклад:



Така послідовність містить нуклеозид на 5'-кінці (аденозин), який має вільну гідроксильну групу, та 3'-кінцевий нуклеотид (гуанозин), який також має вільну гідроксильну групу, але уже у третьому положенні рибози.

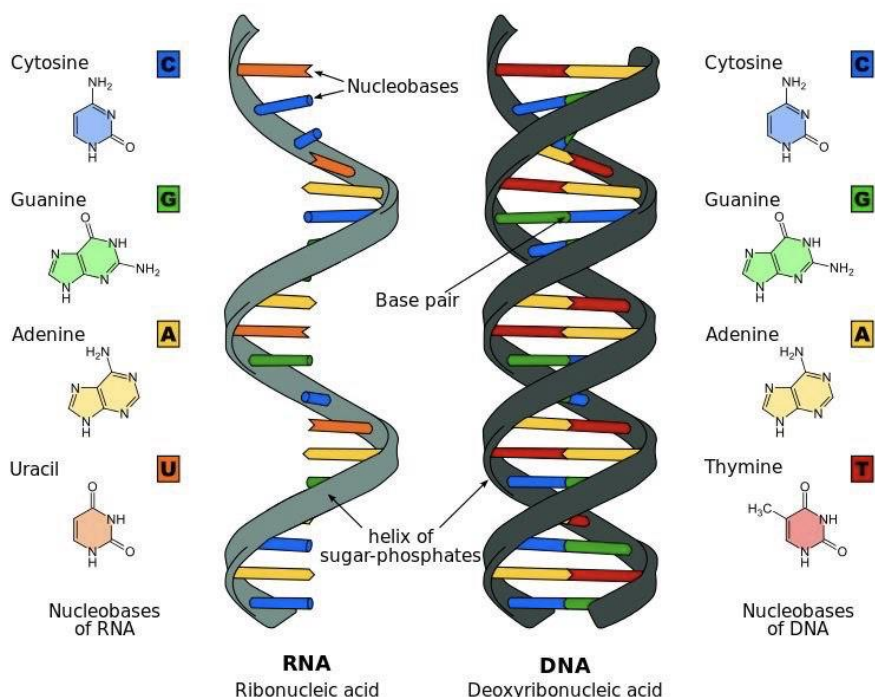


Рисунок 5.4. Порівняння структури дволанцюгової ДНК та одноланцюгової РНК та азотистих основ, що входять до їх складу

Для зручності позначки фосфат взагалі опускають, іноді спеціально вказують обидва кінці. Беручи це до уваги, подвійна антипаралельна послідовність хеліксу може бути записаною як:



Як правило, записують лише 5'-3' ланцюг:



Іноді для підкреслювання природи нуклеотиду, до позначок у послідовності додають d (дезоксирибоза) або r (рибоза). Наприклад:



Основна функція нуклеїнових кислот – це збереження та реалізація спадкової інформації, передача її від батьківських форм нащадкам.

Загалом існують різні типи **РНК**: кодуєчі матричні мРНК (або інакше інформаційні іРНК), некодуєчі рибосомальні (рРНК), транспортні (тРНК), малі некодуєчі, довгі некодуєчі та інші.

Всі ці типи РНК синтезуються на основі ДНК у процесі транскрипції. Їхня роль у біосинтезі білків та інших процесах життєдіяльності клітини різна. Матрична РНК містить інформацію про послідовність амінокислот у білку, рибосомальні РНК служать основою для рибосом (складних нуклеопротеїнових комплексів, основна функція яких – збірка білку з окремих амінокислот на основі мРНК), транспортні РНК доставляють амінокислоти до місця збірки білків – в активний центр асоційованої рибосоми, в основному активному центрі якої відбувається синтез білка відповідно до триплетів нуклеотидів мРНК.

Біологічна роль нуклеїнових кислот надзвичайно важлива. Адже одна з головних їхніх функцій – участь у синтезі білків. У процесі життєдіяльності білки постійно витрачаються, і тому вони мають регулярно відтворюватися за участі нуклеїнових кислот. Увесь синтез середньої білкової молекули, що містить сотні амінокислотних залишків, триває в живому організмі близько однієї хвилини.

Визначення кількості нуклеїнових кислот в розчині найчастіше здійснюють методом спектрофотометрії.

УФ-спектроскопія – точний та швидкий метод, який характеризується високою чутливістю і дає змогу виявляти незначні кількості речовини. У молекулярно-біологічній практиці спектрофотометричний метод знайшов широке застосування для якісного та кількісного аналізу білків і нуклеїнових кислот.

Під терміном «**спектрофотометрія**» розуміють методи, які дають змогу виміряти вибіркове поглинання речовиною електромагнітного випромінювання певною довжини хвилі. Якщо середовище неоднорідне, то під час взаємодії електромагнітного випромінювання з речовиною, окрім процесу поглинання, відбудеться його розсіювання.

Основним законом адсорбційної спектрофотометрії є **закон Бугера-Ламберта-Бера**, який звучить таким чином. Під час проходження монохроматичного пучка світла крізь поглинаюче середовище товщиною l його інтенсивність (I_0) зменшується до величини I :

$$I = I_0 \cdot 10^{\varepsilon dc}, \quad (5.6)$$

де: I – інтенсивність світла, яке пропускається середовищем,

I_0 – інтенсивність падаючого світла,

ε – молярний коефіцієнт поглинання (чисельно дорівнює інтенсивності поглинання 1 молярного розчину речовини за довжини оптичного шляху в 1 см і тому виражений в $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$),

d (інколи l) – довжина оптичного шляху (см),

c – концентрація середовища (моль/см³).

Спектр поглинання речовини – це залежність кількості поглинутого світла від довжини хвилі. Спектрофотометричний аналіз препаратів нуклеїнових кислот (НК) використовують для визначення :

- концентрації молекул нуклеїнових кислот у дослідних зразках. Цей показник є важливим для оцінки виходу ДНК або РНК з різних біологічних об'єктів;
- ступеня очищення ДНК і РНК від домішок клітинних компонентів;
- полімерності фрагментів ДНК та розміру геномів;
- нуклеотидного складу ДНК за температурою плавлення.

Загальним методом розрахунку концентрації будь-якої речовини є графічний метод. Для цього готують серію еталонних розчинів з різною концентрацією (C) і за певної довжини хвилі вимірюють їхні величини поглинання світла (A). Будують калібрувальний графік у координатах A - C .

Спектрофотометричне визначення чистоти препаратів нуклеїнових кислот. Під час виділення препаратів нуклеїнових кислот не завжди вдається позбутися домішок білка та інших біологічних молекул. Для подальшої роботи з цими препаратами необхідно визначити **ступінь очищення ДНК** від домішок. Для цього вимірюють поглинання за довжини хвиль 280 та 230 нм. Ці довжини хвиль близькі до максимумів поглинання, відповідно, білків та інших домішок, і дають змогу визначити їхній вміст у препараті. Для кількісної характеристики ступеня чистоти препаратів нуклеїнових кислот обчислюють величину співвідношень A_{260}/A_{230} та A_{260}/A_{280} . Що вищим є показник, то менше домішок містить препарат. Для високоочищених препаратів ДНК та РНК величина цих співвідношень має дорівнювати 2.

Оцінка нативності препаратів ДНК. У процесі виділення ДНК її молекули можуть руйнуватися під дією гідродинамічних сил, температурних та хімічних чинників. **Нативність препаратів ДНК** також можна охарактеризувати за допомогою спектрофотометрії. Спектри поглинання ДНК і РНК зумовлені накладанням спектрів мономерних нуклеотидів, тому основна смуга поглинання цих біополімерів виявляється за довжині хвилі 260 нм. Однак найбільша величина поглинання світла нативною ДНК дорівнює 260 нм і є значно меншою, ніж загальне поглинання всіма основами, що входять до її складу. Під час денатурації та переходу від дволанцюгових структур до одноланцюгових відбувається зростання величини оптичного поглинання. Зумовлено це тим, що у дволанцюговій молекулі ДНК та у дволанцюгових ділянках РНК площини нуклеотидних основ орієнтовані паралельно одна одній, що приводить до зниження величини поглинання внаслідок вертикальної взаємодії основ – **стекінгу**. Явище зростання величини оптичного поглинання у разі денатурації молекули ДНК називається **гіперхромним ефектом (ГЕ)**. Цей показник використовують як критерій денатурації ДНК.

Для характеристики нативності ДНК спочатку вимірюють поглинання світла її водним розчином за кімнатної температури (A_1), після чого на цей розчин діють денатуруючими чинниками та повторно визначають величину оптичного поглинання (A_2). Величину GE розраховують за формулою:

$$GE = \frac{A_2 - A_1}{A_1} \cdot 100\% . \quad (5.7)$$

GE посилюється у разі збільшення довжини ланцюга ДНК. Препарат з меншою величиною GE вважають деградованим.

Що стосується **визначання концентрації нуклеїнових кислот** у препараті, наприклад, нативних дріжджів, то визначання вмісту нуклеїнових кислот зазвичай проводять **методом Спіріна**.

Метод базується на гідролізі наважки дріжджів в 0,5 н розчині HClO_4 та подальшому вимірюванні на спектрофотометрі різниці екстинкцій цього гідролізату за довжини $\lambda=270$ нм і $\lambda=290$ нм. Для розрахунку беруть різницю екстинкцій $A_{270}-A_{290}$. Ділення цієї величини на 0,19 (це – значення A_{270} для стандартних розчинів дріжджової РНК) показує кількість мкг нуклеїнового фосфору. Для перерахунку кількості нуклеїнового фосфору в сумарну кількість нуклеїнових кислот користуються середнім перерахунковим коефіцієнтом 10,3 (якщо препарат містить лише РНК, то коефіцієнт дорівнює 10,5, якщо лише ДНК – 10,1). Чим гостріший пік, тим чистіший препарат.

У всіх випадках рекомендують проводити контрольне вимірювання за $\lambda=260$ нм. у цьому разі оптична густина має відрізнитись від A_{270} не більше, ніж на 15 %. Більше відхилення вказує на наявність великої кількості домішок, тоді необхідна додаткова обробка гідролізату 0,2 н розчином HClO_4 на холододу.

Формули для розрахунку:

$$HK = \frac{10,3(A_{270} - A_{290})}{0,19}, \text{ мкг/см}^3. \quad (5.8)$$

У разі розведення в P разів, формула для розрахунку кількості нуклеїнових кислот матиме вигляд:

$$HK = \frac{10,3(A_{270} - A_{290}) \cdot P}{190}, \text{ мкг/см}^3. \quad (5.9)$$

Хід роботи

1 Спектрофотометричне визначення нуклеїнових кислот. Для визначення кількості нуклеїнових кислот культуральну рідину попередньо обробити ультразвуком з частотою 29,4 кГц та потужністю 70 Вт у діапазоні впливу 0, 5, 10, 15 та 20 хв. Потім відібрану пробу 10 мл дезінтегрованої культуральної рідини центрифугувати за 10000 об/хв впродовж 15 хвилин.

Отриману надосадну рідину злити в пробірку, а потім відібрати 1 мл в окрему пробірку і додати 10 мл 0,5 н розчину перхлорної кислоти (HClO_4). У разі необхідності отриману надосадну рідину попередньо, до додавання перхлорної кислоти, розводять. Отриманий розчин кип'ятити точно 20 хв по секундоміру на водяній бані, а потім охолодити до кімнатної температури.

Охолоджений розчин налити в кювету 1 см^3 та на спектрофотометрі виміряти поглинання за довжини хвилі 270 нм та 290 нм. Контролем є 0,5 н розчин перхлорної кислоти (HClO_4).

Розрахувати вміст НК у препараті за формулою 5.8. Для порівняння виміряти оптичну густину за довжини хвилі 260 нм та розрахувати кількість нуклеїнових кислот за формулою для очищених препаратів:

$$НК = 50 \cdot A_{260} \cdot P. \quad (5.10)$$

2 Визначення концентрації нативних нуклеїнових кислот. Для цього необхідно приготувати розчин ДНК та РНК в ТЕ-буфері. Далі внести 3 см^3 приготовленого розчину в чисту спектрофотометричну кювету товщиною 1 см та об'ємом 3 см^3 (у разі використання кювет іншого об'єму вносять, відповідно, більше або менше розчину) та виміряти оптичне поглинання розчином НК за $\lambda=260$ нм (A_{260}).

Якщо величина оптичного поглинання дуже велика (близька до максимуму шкали), то слід тестований препарат розвести вдвічі. Ретельно перемішати розчин піпетуванням та повторно виміряти величину оптичного поглинання. У разі необхідності приготувати розведення більшої кратності. Якщо величина оптичного поглинання препарату близька до нуля, то приготувати препарат з більшою концентрацією НК.

Якщо величина оптичного поглинання за $\lambda=260$ нм становить від 0,1 до 0,5, то концентрація НК у цьому препараті є оптимальною для подальшої роботи. Отримані дані записати у таблицю 5.1.

3 Визначення спектра поглинання світла препаратами НК. Для цього необхідно виміряти величину оптичного поглинання світла (A) досліджуваним препаратом НК за $\lambda=320$ нм, $\lambda=300$ нм, $\lambda=280$ нм, $\lambda=260$ нм, $\lambda=240$ нм. Отримані дані записати у таблицю 5.1.

4 Оцінка нативності препаратів ДНК за гіперхромним ефектом. Ураховуючи отримані дані щодо концентрації препарату НК, приготувати розчин ДНК у воді або ТЕ-буфері з концентрацією близько 20 мкг/см³. Виміряти величину оптичного поглинання препарату за кімнатної температури за $\lambda=260$ нм (A_1). Отримане значення записати у таблицю 5.1.

Далі цей самий розчин інкубувати в пробірці на водяній бані з температурою 100 °С протягом 10 хв, а потім швидко охолодити у крижаній бані. Повторно виміряти величину оптичного поглинання за $\lambda=260$ нм (A_2) і отримані дані занести в таблицю 5.1.

Таблиця 5.1 – Результати аналізу нативних розчинів нуклеїнових

Зразок	Розведення	Показання спектрофотометра							Розрахункові дані			
		A ₃₂₀	A ₃₀₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀	A ₂₄₀	A ₂₆₀		C ₀ , мкг/см ³	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	ГЕ, %
							A ₁ 20, С	A ₂ 100, С				
ДНК	без розв.											
	1:1											
	1:3											
РНК	без розв.						-	-				
	1:1						-	-				
	1:3						-	-				

5 Обробка результатів. Розрахувати кількість нуклеїнових кислот за формулами 5.8 та 5.10 в культуральній рідині, отриманій після проведення досліджень в пункті 1. На основі отриманих даних побудувати графік залежності кількості нуклеїнових кислот залежно від тривалості обробки ультразвуком.

Дані, отримані в пунктах 2-4, занести в таблицю 5.1. За даними, отриманими в пункті 2, побудувати спектр залежності оптичної густини препарату від довжини хвилі.

Визначити вихідні концентрації отриманих препаратів нуклеїнових кислот. Для обчислення концентрації ДНК можна використати спрощену формулу:

$$C_o = A_{260} \cdot n. \quad (5.11)$$

де n – концентрація розчину нуклеїнової кислоти. Приймаємо для ДНК $n=50$ мкг/см³ (концентрація розчину дволанцюгової ДНК (або дволанцюгової РНК), оптичне поглинання якого за $\lambda=260$ нм становить 1 оптичну одиницю) та $n=40$ мкг/см³ (концентрація розчину одноланцюгової РНК (або ДНК), оптичне поглинання якого за $\lambda=260$ нм становить 1 оптичну одиницю).

Визначити чистоту препаратів НК. Для цього обчислити величину співвідношення: A_{260}/A_{280} та A_{260}/A_{230} . А також визначають гіперхромний ефект за формулою 5.7.

За результатами проведеного експерименту зробити висновки.

Питання для самоконтролю.

1. Що таке нуклеїнові кислоти?
2. Що таке ДНК?
3. Що таке РНК?
4. Які основні функції нуклеїнових кислот?
5. Якими способами можна визначати кількість нуклеїнових кислот в розчині?

6. Для чого використовують спектрофотометричний метод визначення кількості нуклеїнових кислот?
7. Що таке ступінь очищення ДНК? Як його визначити?
8. Яким чином проводять оцінку нативних препаратів ДНК?
9. Що таке гіперхромний ефект? Як його визначають?
10. У чому полягає метод Спіріна?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

ВИВЧЕННЯ СПОСОБІВ ЯКІСНОГО АНАЛІЗУ АНТИБІОТИКІВ РІЗНИХ ГРУП ПРИНАЛЕЖНОСТІ

Мета роботи: навчитись визначати за характером протікання хімічних реакцій приналежність досліджуваної речовини до певної групи антибіотиків.

Матеріали та обладнання: штативи з пробірками, піпетки.

Реактиви: різні зразки антибіотиків, антимікробні препарати, ацетон, хлороформ, соляна кислота, нітратна кислота, сірчана кислота, хлорне залізо, гідроксид натрію, оцтова кислота, нітрат міді, гідроксиламін, нітропрурид натрію, нінгідрин, реактив Фелінга, азотна кислота, α -нафтол, гіпобромід натрію, хлорид барію, нітриту натрію, аміак, нітрит натрію, нафтол, цинковий пил, β -нафтолу, залізоамонійні квасці, вуглекислий натрій, реактив Фоліна, перманганату калію, вода дистильована.

Теоретичні відомості

Антибіотики – органічні речовини, що синтезуються мікроорганізмами в природі для захисту від інтервенції інших видів мікроорганізмів, та мають здатність пригнічувати розвиток або вбивати цих мікробів.

Як правило, антибіотики є продуктом життєдіяльності бактерій або грибів. Існує також велика кількість напівсинтетичних антибіотиків, які відрізняються модифікаціями функціональних груп природних антибіотиків. Такі модифіковані сполуки часто ефективніші або стійкіші до нейтралізації, що виникає внаслідок набутої мікроорганізмами резистентності (стійкості).

Але активність антибіотиків щодо інгібування росту патогенних мікроорганізмів не є постійною, а з часом знижується, що зумовлено формуванням стійкості; резистентні збудники становлять небезпеку не тільки для пацієнта, в якого вони виділені, а й для багатьох інших людей, навіть розділених простором і часом.

Традиційно антибіотики поділяють на **природні** (пеніциліни, лінкоміцин, ванкоміцин та ін.) та **напівсинтетичні** (продукти модифікації природних молекул: амоксицилін, кліндаміцин, цефазолін тощо). Прийнятий розподіл на групи, класи і покоління (генерації) має велике значення з погляду розуміння механізму дії, спектра активності, особливостей фармакодинаміки і фармакокінетики, характеру небажаних побічних реакцій, вибіркової дії тощо.

За спектром дії антибіотики поділяють на п'ять груп залежно від того, на які об'єкти вони чинять вплив:

- 1 група – **антибактеріальні антибіотики**, становлять найчисленнішу групу препаратів. Вони поділяються на антибіотики вузького спектру дії, які активні щодо тільки грампозитивних мікроорганізмів або, в рідкісних випадках, щодо грамнегативних мікроорганізмів, і антибіотики широкого спектру дії, які активні щодо як грампозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів;
- 2 група – **протитуберкульозні препарати**, до яких відносять антибіотики, які пригнічують розмноження і розвиток мікобактерій туберкульозу (туберкулостатична дія) або спричиняють їх загибель (туберкулоцидна дія);
- 3 група включає **протигрибкові антибіотики** – це препарати, що застосовуються для лікування грибкових захворювань і мають фунгіцидну та фунгістатичну дію;
- 4 група – **антипротозойні антибіотики**, що пригнічують життєдіяльність найпростіших та застосовуються у лікуванні протозойних інфекцій;
- 5 група – **протипухлинні антибіотики**, які представлені препаратами, що проявляють цитотоксичну дію.

За характером впливу на бактеріальну клітину антибіотики можна розділити на три групи:

- **бактеріостатичні** – у разі взаємодії з антибіотиком бактерії залишаються живі, але не здатні розмножуватися;

- **бактерицидні** – у разі взаємодії з антибіотиком бактерії гинуть, але фізично продовжують бути присутнім в середовищі);
- **бактеріолітичні** – після взаємодії з антибіотиком бактерії гинуть, і руйнуються бактеріальні клітинні стінки.

Класифікація за хімічною структурою, яку широко використовують в медичному середовищі, складається з таких груп:

- **бета-лактамні антибіотики** містять β -лактамне кільце. Антибіотики цієї групи представлено як природними, так і напівсинтетичними препаратами, що мають високу клінічну ефективність і низьку токсичність, тому найбільш широко використовуються у медицині. Механізм дії β -лактамних антибіотиків спрямований на порушення синтезу клітинної стінки бактерій, вони поділяються на чотири підгрупи: **пеніциліни** – виробляються колоніями цвілевих грибів *Penicillium* та діють проти більшості класичних бактеріальних інфекцій; **цефалоспорини** – мають схожу структуру з пеніцилінами, використовуються для боротьби з бактеріями, що стійкі до пеніциліну; **карбапенеми** – використовується проти бактерій стійких до цефалоспоринів, у тому числі проти важких інфекцій; **монобактами** – використовуються у лікуванні інфекцій, викликаних грамнегативними бактеріями;
- **макроліди** – антибіотики зі складною циклічною структурою. Мають бактеріостатичну дію. Макроліди відносяться до малотоксичних антибіотиків широкого спектру дії. Чинять переважно бактеріостатичну дію, у високих концентраціях – бактерицидну. Механізм дії пов'язаний з пригніченням синтезу білка в клітинах чутливих мікроорганізмів. Природними макролідами є еритроміцин і олеандоміцин;
- **тетрацикліни** – використовують для лікування інфекцій дихальних і сечовивідних шляхів, лікування тяжких інфекційних хвороб – сибірської виразки, туляремії, бруцельозу. Дія – бактеріостатична. У

високих концентраціях діють на деяких найпростіших. Механізм дії тетрацикліну спрямований на пригнічення синтезу білка в мікробних клітинах;

- **міноглікозиди** за хімічною будовою являють собою сполуки, що включають аміноцукри, з'єднані глікозидним зв'язком з аміноциклічним кільцем. Мають високу токсичність. Використовуються для лікування важких інфекцій типу зараження крові або перитонітів;
- **амфеніколи** – використання обмежене через підвищену небезпеку серйозних ускладнень – ураження кісткового мозку, який виробляє клітини крові. Мають бактеріостатичну дію;
- **глікопептиди** – антибіотики, що порушують синтез клітинної стінки бактерій. Мають бактерицидну дію, проте відносно ентерококів, деяких стрептококів і стафілококів діють бактеріостатично;
- **лінкозаміди** – мають бактеріостатичну дію, що зумовлено пригніченням синтезу білку рибосомами. У високих концентраціях відносно високочутливих мікроорганізмів можуть проявляти бактерицидний ефект;
- **рифампіцини** – блокують синтез нуклеїнових кислот в бактеріальній клітині;
- **поліміксини** (циклічні поліпептиди) – природні антибіотики поліпептидної структури; виявляють бактерицидну дію. Активні відносно грамнегативних бактерій, таких як сальмонели, шигели, клебсієли, ентеробактера, кишкової та гемофільної палички, гемофільної інфлюєнзи та синьо-зеленого гною.

Одним із завдань, яке стоїть перед дослідником у визначенні інгібуючої дії препаратів, які виділяють продуценти, є встановлення їх хімічної природи. Хімічна природа визначає активність і спектр дії препарату, розчинність в біологічних рідинах, швидкість виведення з організму і т. ін. Одними зі швидких якісних методів визначення природи антибіотиків є хімічні методи, які дають змогу провести аналіз належності препаратів до певних груп хімічних речовин.

Хід роботи

1 Проведення якісної реакції на визначення еритроміцину. До 0,1 г антибіотику (або 0,1 мл розчину) додати 0,5 мл ацетону і 0,5 мл концентрованої соляної кислоти. З'являється помаранчеве забарвлення, що поступово переходить в темно-червоне. Потім додати 1 мл хлороформу і збовтати. Спостерігати за забарвленням хлороформного шару.

2 Проведення якісної реакції на визначення тетрацикліну. Якісне визначення тетрацикліну можна проводити двома способами.

2.1 До 5 крапель розчину антибіотику (0,5 %) додати 1 краплю 5 % спиртового розчину хлорного заліза. Спостерігати за появою забарвлення.

2.2 До 5-10 мг порошку тетрацикліну додати 10 крапель концентрованої сірчаної кислоти. Спостерігати за забарвленням рідини.

3 Проведення якісної реакції на визначення пеніциліну. Якісне визначення пеніциліну можна проводити трьома способами.

3.1 До 5-6 крапель водного розчину антибіотика (5-10 мкг/мл) додати 1 краплю реактиву, що складається з 1 мл 1 М розчину гідроксиламіну солянокислого і 0,3 мл 1 М розчину гідроксиду натрію. Через 2-3 хв додати 1 краплю 1 М розчину оцтової кислоти і після перемішування ще додати 1 краплю розчину нітрату міді (5 %). Спостерігати за появою осаду та його забарвленням.

3.2 До 5 крапель антибіотика додати 2 краплі 5 % розчину гідроксиламіну. Суміш нагріти до кипіння. Після охолодження додати 1 краплю 5 % розчину хлорного заліза. Спостерігати за забарвленням, що з'являється.

3.3 До 2 крапель розчину пеніциліну додати дві краплі концентрованого розчину їдкого натру і кип'ятити 1-2 хв. Після охолодження додати по краплях 5%-й розчин нітропрусиду натрію. Спостерігати за появою забарвлення та подальшими його змінами.

4 Проведення якісної реакції на визначення ампіциліну. Якісне визначення ампіциліну можна проводити трьома способами.

4.1 0,02 г ампіциліну розчинити в 2 мл води, додати 2 мл свіжоприготовленого 0,25 %-го нінгідрину і кип'ятити 2-3 хв. Спостерігати за появою забарвлення.

4.2 0,01 г порошку антибіотику розчинити в 1 мл води і додати 1 мл реактиву Фелінга, спостерігати за забарвленням, яке з'являється відразу ж.

5 Проведення якісної реакції на визначення цефалоспоринової. Якісне визначення цефалоспоринової можна проводити двома способами.

5.1 До 20 мг рідкого цефалоспоринової додати декілька крапель 80 % розчину сірчаної кислоти, що містить 1 % азотної кислоти. Спостерігати за появою забарвлення.

5.2 До 20 мг рідкого цефалоспоринової додати 5 крапель 1 % розчину оцтової кислоти, 2 краплі 1 % розчину сульфату міді і 1 краплю 2 н розчину гідроксиду натрію. Спостерігати за появою забарвлення.

6 Проведення якісної реакції на визначення стрептоміцинової. Якісне визначення стрептоміцинової можна проводити трьома способами.

6.1 Реакція на наявність гуанідинових груп. До 3 крапель 1 % водного розчину стрептоміцинової додати 3 краплі 10 % гідроксиду натрію, 3 краплі 0,1 % спиртового розчину α -нафтолу і 3-9 крапель 2 % свіжоприготовленого розчину гіпоброміду натрію. Спостерігати за появою забарвлення.

6.2 До 5-6 крапель досліджуваного розчину (0,5 % або 5-10 мкг/мл) додати 2-3 краплі розчину 10 % розчину гідроксиду натрію і нагрівати на водяній бані протягом 3 хв. Після охолодження додати 5-6 крапель розведеної (10 %) сірчаної кислоти і 2-3 краплі розчину хлорного заліза (3 %). Спостерігати за появою забарвлення.

6.3 До 5-6 крапель розчину стрептоміцинової додати 0,5 мл розчину хлориду барію (5 %). Спостерігати за появою осаду.

7 Проведення якісної реакції на визначення левоміцетину. Якісне визначення левоміцетину можна проводити двома способами.

7.1 До 0,5 мл розчину левоміцетину (0,015 %) додати 1-2 мл розведеної соляної кислоти, 0,1 г цинкового пилю і нагрівати на водяній бані 2-3 хв. Після охолодження розчин профільтрувати. До фільтрату додати 2-3 краплі 0,1 М

розчину нітриту натрію і 0,3-0,5 мл отриманої суміші влити в 1-2 мл розчину β-нафтолу, приготованого на 10 % розчині натрію гідроксиду. Спостерігати за появою забарвлення.

7.2 10 мг левоміцетину струсити з 1 мл 5 % розчину сульфату міді (II), додати 1 мл розчину гідроксиду натрію і струсити 1 хв. Спостерігати за появою осаду та його кольором.

8 Проведення якісної реакції на визначення гентаміцину. До 1 мл розчину антибіотика (5-10 мкг/мл) додати 0,2 мл 0,2 М розчину гідроксиду натрію, нагріти 10 хв. на водяній бані і охолодити 3 хв під струменем холодної води. Потім додати 0,8 мл 1 % розчину залізоамонійних квасців у 0,275 М розчині сірчаної кислоти і перемішати. Реєструвати зміну забарвлення.

9 Проведення якісної реакції на визначення лінкоміцину. У пробірку з притертою пробкою відібрати 1,5 мл досліджуваного розчину антибіотика, додати 0,05 мл насиченого розчину вуглекислого натрію, 0,15 мл розведеного (1:1) реактиву Фоліна і нагріти на водяній бані протягом 15 хв. Розчин охолодити і добре перемішати. Спостерігати за появою забарвлення, яке свідчить про наявність антибіотика.

10 Проведення якісної реакції на визначення ністатину. До 0,05 г порошку додати 1-2 мл крижаної оцтової кислоти і 56 крапель 0,1%-го розчину перманганату калію. Розчин швидко знебарвлюється.

11 Визначення приналежності дослідного антибіотика. Для отриманих отриманих зразків провести якісні реакції для кожної з груп антибіотиків. Порівняти отримані результати з еталонними. Результати роботи представити у вигляді таблиці 6.1 та зробити висновок.

Таблиця 6.1 – Результати якісного аналізу досліджуваної сполуки антибіотика

№ п/п	Результат якісної реакції		Висновки	Механізм дії даної сполуки
	Еталон	Дослідна сполука		

12 Обробка результатів. Проаналізувати результати досліджень, наведені в таблиці 6.1 та зробити висновок, до якої групи належить досліджуваний антибіотик. На основі літературних даних розписати механізм дії якісних реакцій для кожного досліду. Занести результати в таблицю 6.1. На основі отриманих результатів зробити висновок.

Питання для самоконтролю

1. Що таке антибіотики?
2. У чому різниця між природними та напівсинтетичними антибіотиками?
Які ефективніші і чому?
3. Які мікроорганізми здатні продукувати антибіотики?
4. Які групи антибіотиків виділяють залежно від спектру їх дії?
5. Які групи антибіотиків виділяють залежно від характеру впливу на бактеріальну клітину?
6. Які антибіотики називають бета-лактамами?
7. У чому різниця між макролідами та тетрациклінами?
8. У чому різниця між моноглікозидами та амфеніколами?
9. У чому різниця між глікопептидами та лінкозамідами?
10. У чому різниця між рафампіцинами та поліміксинами?

РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ПІДГОТОВКИ, ВИКОНАННЯ ТА ЗАХИСТУ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Оскільки робота в лабораторії несе підвищений ризик для здоров'я та життя студента, то під час підготовки та виконання лабораторних робіт потрібно дотримуватися «Правил техніки безпеки та охорони праці» описаних у відповідному розділі даного посібника. На першому в семестрі занятті викладач ознайомлює здобувачів з цими правилами, які є обов'язковими для виконання. Після ознайомлення студенти розписуються у відповідному журналі про ознайомлення з «Правилами техніки безпеки та охорони праці при роботі в лабораторії»

Під час підготовки до лабораторної роботи студент зобов'язаний ознайомитися з протоколом виконання лабораторної роботи та вивчити порядок виконання дослідів, передбачених роботою. Чітко знати, яке обладнання, посуд та реактиви необхідні для її виконання. Усі роботи, в межах передбачених дослідів, виконуються студентом під керівництвом викладача або лаборанта, особливо під час роботи з лабораторним обладнанням. Студент зобов'язаний слідкувати за чистотою робочого місця та ходом проведення дослідів, передбачених лабораторною роботою.

На лабораторне заняття здобувач повинен приходити з підготованим протоколом роботи, який включає такі необхідні розділи: тема, мета, матеріали та обладнання, реактиви, хід роботи. Протокол виконують на листах формату А4 з використанням персонального комп'ютеру. Для оформлення протоколу використовують шрифт Times New Roman 14 кеглем та 1,5 міжрядковим інтервалом з вирівнюванням тексту за шириною сторінки. За необхідності ключові елементи протоколу можна виділити напівжирним шрифтом або курсивом. На першій сторінці необхідно вказати ПІБ студента, групу та назву дисципліни. Усі рисунки та таблиці повинні бути пронумеровані та мати назву. **До виконання лабораторної роботи допускаються лише ті студенти що мають протоколи та знають порядок проведення дослідів!**

Усі результати дослідів студент заносять в протокол по ходу виконання лабораторної роботи (допускається заносити результати отримані під час виконання роботи від руки). За необхідності проводять фотозйомку отриманих результатів.

Обробка отриманих результатів вимагає проведення необхідних розрахунків та аналізу отриманих результатів. За необхідності порівняти отримані дані з літературними. **Обов'язково протокол повинен містити обґрунтовані висновки!**

Під час підготовки до захисту здобувач має відповісти на короткі запитання, неведені в кінці кожної лабораторної роботи. Під час захисту лабораторної роботи студент в усній формі відповідає на запитання викладача. Для отримання максимальної оцінки студент повинен дати вичерпну відповідь на запитання викладача та навести аргументи, які будуть свідчити про те, що він розуміє природу та механізми отримання саме таких результатів і може пояснити їх відмінність від літературних даних, у разі необхідності. У разі володіння студентам теоретичним матеріалом повною мірою, але нездатності проаналізувати отримані результати, він отримує оцінку, яка становить 75 % від максимальної. У разі неповної відповіді на теоретичні запитання та відсутності аналізу отриманих результатів оцінка здобувача становитиме 50 % від максимально можливої. Якщо студент припускає значні помилки на теоретичні запитання та не може обґрунтувати отримані результати, його оцінка складатиме 25 % від максимальної. У разі відсутності відповіді на запитання студент отримує 0 балів.

Якщо здобувач був відсутній на лабораторному занятті без поважної причини, до нього застосовуються штрафні санкції (віднімаються штрафні бали, передбачені силабусом дисципліни).

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

1. Особливості дотримання техніки безпеки при роботі в біохімічній та хімічній лабораторіях: навч. посібник для студентів та викладачів вузів / К. В. Александрова, В. М. Швець, М. В. Дячков, Д. А. Васильєв. – Запоріжжя: ЗДМУ, 2017. – 76 с.
2. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник / М. Д. Мельничук, О. Л. Кляченко, В. В. Бородай, Ю. В. Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д. Ю., 2014. – 252 с.
3. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості // В трьох томх / Ю. І. Сидоров, Р. Й. Влезло, В. П. Новіков. – Львів: Видавництво Національного університету «Львівська політехніка», 2004. – 252 с.
4. Методи молекулярної біотехнології: Лабораторний практикум / О. І. Мартиненко. – Київ: Академперіодика, 2010 – 232 с.
5. Основи молекулярної біології-1. Молекулярна біологія ДНК: Лабораторний практикум: навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» // Електронний ресурс / А. І. Степаненко, О. Р. Лахнеко, Л. В. Маринченко, М. О. Банникова. – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021. – 70 с.
6. Біотехнологія антибіотиків: Лабораторний практикум: навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія», освітня програма «Біотехнології» / Л. Б. Орябінська, Л. П. Дзигун, В. Ю. Поліщук. – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. – 40 с.
7. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Загальна біотехнологія» для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти за освітньо-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія» зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія / Укл.: О. Ю. Філімоненко. – Кам'янське: ДДТУ, 2019.–35 с.

8. Розробка спектрофотометричної методики визначення флавоноїдів у пагонах чорниці звичайної / Л. В. Вровська. – Фармацевтичний часопис. № 4, 2018. – с. 49-56.
9. Фармакогнозія і ресурсознавство лікарських рослин. Навчальний посібник / А. Р. Грицик, В. М. Водославський, М. В. Мельник. – Івано- Франківськ: ПП Голіней О. М., 2019. – 251 с.
10. Загальна біотехнологія: методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для напрямку підготовки 0929 «Біотехнологія» / Укл.: Т. С. Тодосійчук, І. Р. Клечак, Л. П. Дзигун. – Київ: НТУУ «КПІ», 2006. – 56 с.
11. Біосепарація [Електронний ресурс]: методичні вказівки до проведення лабораторних робіт для студентів напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» спеціальності 7(8)05140102 «Молекулярна біотехнологія» денної форми навчання / Л. В. Маринченко, С. В. Горобець, І. В. Дем'яненко, Ю. В. Карпенко // Електронні текстові дані (1 файл: 3,95 Мбайт). – К.: НТУУ «КПІ», 2014. – 99 с.