

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

БІОТЕХНОЛОГІЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ВИРОБНИЦТВ ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

Навчальний посібник

Рекомендовано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
як навчальний посібник для здобувачів ступеня бакалавра
за освітньою програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Електронне мережне навчальне видання

Київ
КПІ ім. Ігоря Сікорського
2022

Автори *Ліновицька В.М.*, канд. біолог. наук
Поліщук В.Ю., канд. техн. наук
Дзигун Л.П., канд. біолог. наук
Тітова Л.О., канд. техн. наук
Іванова Т.С., канд. біолог. наук

Рецензент *Михайлова О. Б.*, канд. біолог. наук, старш. наук. співроб.,
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України

Відповідальний редактор *Клечак І. Р.*, канд. техн. наук, доцент,
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

*Гриф надано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
(протокол № 6 від 24.06.2022 р.)
за поданням Вченої ради факультету біотехнології і біотехніки
(протокол № 11 від 14.06.2022 р.)*

У навчальному посібнику викладено сучасні підходи, методи і засоби, що застосовуються на етапах створення, впровадження, використання, контролювання препаратів та продуктів біотехнологічного походження, призначених для застосування у агропромисловому комплексі. А саме, розглянуто питання мікробіологічного контролю ґрунтів, аналізування біопрепаратів для рослинництва та тваринництва (біодобрива, корми, вітаміни), а також утилізацію відходів сільського господарства біологічними методами з отриманням кормових препаратів.

Кожна лабораторна робота містить короткі теоретичні відомості, дизайн виконання, вимоги до оформлення та контрольні запитання.

Призначений для здобувачів ступеня бакалавра за спеціальністю «Біотехнології та біоінженерія».

Реєстр. № НП 21/22-707. Обсяг 2,3 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.

© В. М. Ліновицька, В. Ю. Поліщук, Л. П. Дзигун, Л. О. Тітова, Т. С. Іванова
© КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022

ЗМІСТ

ВСТУП	4
ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ	5
ТЕМА 1. ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО ВИРОБНИЦТВА	
Лабораторна робота 1	
Визначення та аналіз стану мікрофлори ґрунту	7
ТЕМА 2. ПЕРЕРОБКА ВІДХОДІВ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА З ВИКОРИСТАННЯМ БІОТЕХНОЛОГІЇ	
Лабораторна робота 2	
Переробка відходів рослинництва з метою отримання кормового білку	15
Лабораторна робота 3	
Біотехнологія отримання кормів силосуванням	26
ТЕМА 3. БАКТЕРІАЛЬНІ ТА БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ ПРЕПАРАТИ ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА	
Лабораторна робота 4	
Виділення культури-продуценту азотних біодобрих	33
Лабораторна робота 5	
Біотехнологічні препарати азотних біодобрих	37
ТЕМА 4. БАКТЕРІАЛЬНІ ТА БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ ПРЕПАРАТИ ДЛЯ ТВАРИННИЦТВА	
Лабораторна робота 6	
Дослідження особливостей культивування продуцента кормового рибофлавіну	41
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	49
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	49
Додаток А Схема аналізу силосу	51

ВСТУП

Лабораторні роботи з дисципліни „Біотехнологія сільськогосподарських виробництв” на практичних прикладах дозволяють краще зрозуміти значення біотехнології для сільського господарства, а також надають можливість засвоїти біотехнологічні методи та засоби, що використовуються в сільськогосподарських виробництвах.

Мета лабораторних робіт з дисципліни „Біотехнологія сільськогосподарських виробництв” – набути навичок, необхідних для проведення досліджень ґрунтів, бактерійних добрив, силосу, отримання кормового білку та вітамінів, а також навчитися аналізувати отриманні дані та надавати висновки та рекомендації.

Особливістю практикуму є те, що частина робіт передбачають не менше ніж два заняття. Крім того, в зв’язку з різним терміном культивування культур, що виділяються та досліджуються, студентам необхідно мати можливість оцінки результатів протягом 15–20 хвилин через 2–4 доби після заняття (наприклад на перерві між заняттями за розкладом).

До кожної лабораторної роботи студент повинен оформити у зошиті протокол заняття (у вигляді тексту, нумерованого списку, блок-схеми тощо), ознайомитись з теоретичними відомостями за темою заняття та знати хід виконання роботи. Результати виконання заняття (описи, рисунки та розрахунки) заносяться у протокол та подаються на перевірку викладачеві в кінці заняття. По виконанню всієї лабораторної роботи студент готує повністю оформлений протокол де, застосовуючи теоретичні відомості, лекційний та допоміжний матеріал, наводить розрахунки, рисунки культур (бактерії, дріжджі, мікро- та макроміцети тощо) з обов’язковим вказуванням збільшення при якому їх розглядали, та наводить висновки.

В залежності від обсягу дисципліни (семестрове годинне навантаження) кількість виконуваних лабораторних робіт може змінюватися. Норми бального оцінювання наводяться у рейтинговій системі оцінювання (PCO) в Силабусі дисципліни.

ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

1. Під час перебування та виконання робіт у біотехнологічній лабораторії слід суворо дотримуватись вимог з безпеки та охорони праці, викладених в інструкції. У разі, якщо здобувач вищої освіти не ознайомлений із зазначеними вимогами, він повинен повідомити про це викладача. Здобувач вищої освіти несе персональну відповідальність за власну безпеку під час перебування у лабораторії, що підтверджує особистим підписом у журналі з безпеки та охорони праці під час проведення інструктажу.
2. В лабораторії категорично забороняється вживати їжу та напої.
3. В лабораторії та інших приміщеннях категорично забороняється палити.
4. У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі. Усі здобувачі вищої освіти повинні працювати в чистих бавовняних халатах, які мають бути застібнуті на всі гудзики. Волосся необхідно прибрати з обличчя та сховати під шапочку.
5. Студентам забороняється починати роботу без дозволу викладача.
6. На лабораторних столах не повинно бути зайвих речей, лише необхідне лабораторне та канцелярське приладдя.
7. При роботі з біологічним матеріалом необхідно використовувати тільки загальноприйняті асептичні прийоми, які запобігають контамінуванню досліджуваних об'єктів і виключають можливість контактування з ними студента.
8. При виконанні асептичних робіт необхідно працювати в стерильній зоні полум'я газового пальника або спиртівки. Розташовувати пальник або спиртівку потрібно на відстані не менше, ніж 20 см від краю робочого стола. При використанні відкритого полум'я необхідно впевнитись у його стійкому та зручному розташуванні на робочому столі. Запалювати спиртівку та газовий пальник можна лише за допомогою сірника. При роботі зі спиртівками забороняється запалювати спиртівки одну від одної. Гасити запалену спиртівку потрібно, закривши доступ повітря спеціальним ковпачком, а газовий пальник – перекриттям вентиля доступу газу. Запалену спиртівку заборонено пересувати з місця на місце. По закінченню роботи з газовими пальниками необхідно перекрити газовий кран. У разі випадкового займання ватяно-марлевої пробки, паперового ковпачка або інших легкозаймистих матеріалів, що знаходяться на робочій поверхні, необхідно терміново загасити полум'я, закривши доступ повітря.

9. Забороняється при роботі зі спиртом та іншими легкозаймистими рідинами нагрівати їх на відкритому вогні, на сітці, поблизу відкритого полум'я або у відкритих посудинах.
10. У лабораторії необхідно дотримуватися правил безпеки під час роботи з хімічними речовинами. За необхідності (робота з концентрованими хімічними речовинами) потрібно використовувати засоби індивідуального захисту (рукавички, респіратори, гумовий фартух, захисні окуляри). У разі потрапляння будь-яких хімічних речовин на шкіру необхідно змити реактив великою кількістю води; нейтралізувати кислоту необхідно слабким розчином соди, а луг – слабким розчином оцтової кислоти. Роботу з концентрованими та леткими хімічними речовинами необхідно проводити під витяжною шафою. Розбавлення концентрованої сірчаної кислоти необхідно виконувати доливанням кислоти у воду, а не навпаки і тільки з використанням термостійкого посуду.
11. Необхідно суворо дотримуватися вимог електробезпеки. Забороняється використовувати несправне електрообладнання і вмикати прилади без дозволу викладача або лаборанта, а також торкатися поверхні приладу мокрими руками.
12. По закінченню роботи студент повинен передати непотрібний для подальших робіт біологічний матеріал на знешкодження, прибрати та упорядкувати робоче місце. Руки необхідно за потреби обробити дезінфікувальним розчином та ретельно вимити.

ТЕМА 1. ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО ВИРОБНИЦТВА

Лабораторна робота 1

ВИЗНАЧЕННЯ ТА АНАЛІЗ СТАНУ МІКРОФЛОРИ ҐРУНТУ

(2 заняття)

Мета роботи: оволодіння навичками застосування методів аналізу мікрофлори ґрунтів, отримання накопичувальних культур мікроорганізмів ґрунту, аналізу отриманих даних та надання висновків стосовно мікробіологічного стану ґрунтів та рекомендацій щодо використання біопрепаратів для покращення родючості ґрунту.

Короткі теоретичні відомості

Основним засобом сільськогосподарського виробництва є ґрунти. Родючість ґрунтів обумовлена низкою різноманітних показників, які можна поділити на агрофізичні, агрохімічні та біологічні. До біологічних показників належать: вміст органічних речовин у ґрунті, вміст гумусу, біологічна активність ґрунту, засміченість ґрунту рослинними залишками бур'янів, шкідниками, патогенами культурних рослин. Біологічні показники значно залежать від якісного та кількісного складу бактерій, дріжджів, мікро- та макроміцетів, тобто від характеристик мікрофлори ґрунту. Крім того, цей параметр є найбільш чутливим до негативних антропогенних та природних впливів, тому постійний контроль кількісного та якісного складу мікроорганізмів в ґрунті є актуальним завданням.

В різних з хімічної та кліматичної точки зору ґрунтах присутні і різні групи мікроорганізмів, що можуть бути корисними, шкідливими або нейтральними для землеробства. Їх визначення проводиться із застосуванням відповідних субстратів, з урахуванням біохімічних процесів, що в них відбуваються.

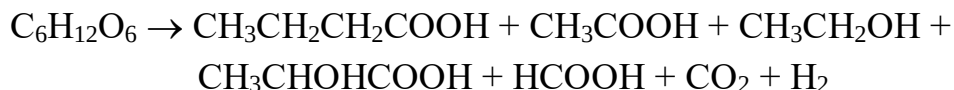
Мікроорганізми, що зброджують целюлозу. В анаеробних умовах целюлоза руйнується різними спороутворювальними бактеріями, розповсюдженими в ґрунті, гної, рослинних тканинах, що розкладаються, рубці жуйних тварин.

Спрощено цей процес може бути представлений таким чином:

Перший етап – гідроліз целюлози целюлазою, утворення дисахариду целобіози, її гідроліз целобіазою і утворення моносахаридів (глюкози):



Другий етап – зброджування глюкози:



В ґрунті мікроорганізмами, що зброджують целюлозу є переважно грампозитивні бактерії роду *Clostridium*. На елективних середовищах в мезофільних умовах (сольове середовище з целюлозою як єдиним джерелом вуглецю, при інкубуванні за +30–35°C) розвиваються *Clostridium omelianskii* – довгі, тонкі палички с круглою спорою на кінці (рис. 1.1).

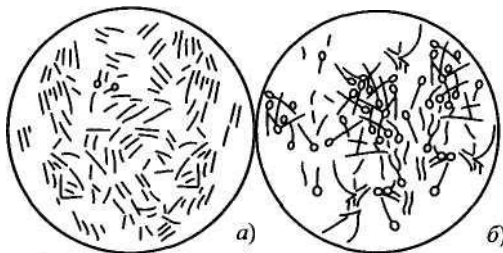
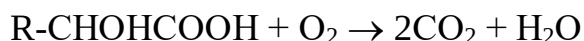


Рис. 1.1. *Clostridium omelianskii*:

а) молоді клітини; б) клітини зі спорами (Теппер, 2004)

Мікроорганізми, що окислюють целюлозу. У збагаченому киснем ґрунті целюлозу окислюють аеробні мікроорганізми (бактерії, гриби і актиноміцети). Вони здатні синтезувати ферменти целюлазу та целобіазу, які гідролізують целюлозу до глюкози, яку потім окислюють до CO_2 і H_2O . Проміжними продуктами окислювання є оксикислоти:



Найчастіше в ґрунтах зустрічаються аеробні, здатні до окислення целюлози мікроорганізми, що належать до наступних родів:

Cytophaga (рис. 1.2, а) – злегка вигнуті, досить довгі (3–8 мкм) палички із загостреними кінцями. З часом стають укороченими паличками з округлими кінцями, можливий перехід і в кулясту форму – міксоспори або міксоцисти, вкриті слизом (стан спокою). Різні види цього роду утворюють на субстратах з целюлозою колонії у вигляді жовтих, рожевих, пурпурових, червоно-коричневих, іноді безбарвних плям.

Cellvibrio – дрібні, злегка вигнуті у вигляді півмісяця неспороутворюючі палички із закругленими кінцями (рис. 1.2, б). Їх довжина становить 1,3–2 мкм, ширина – 0,2–0,5 мкм. Колонії *Cellvibrio* дуже швидко поширюються по поверхні фільтрувального паперу, забарвлюючи його в жовтий або у жовтогарячий колір.

Cellfalcicula – паличкоподібні клітини, потовщені в центрі, із загостреними кінцями (рис. 1.2, в). Утворюють на целюлозі слизові зелені

колонії, при цьому пігмент легко дифундує в середовище і також забарвлює його у зелений колір.

Polyangium і *Sorangium* – міксобактерії. Клітини представників цих двох родів – циліндричні палички з закругленими кінцями, що з часом стають коротшими і утворюють мікроспори, які зібрані по 12–40 штук у спорангіоли – складові частини плодових тіл (рис. 1.2, з). На папері ці мікроорганізми утворюють колонії у вигляді слизового нальоту жовтого, жовтогарячого або темно-коричневого кольору.

Trichoderma, *Fusarium*, *Alternaria*, *Stachybotris*, *Cladosporium*, *Dematium*, *Fumago* та інші представники дейтероміцетів також інтенсивно розкладають целюлозу. При цьому для них є характерним міцеліальний ріст та різноманітна морфологія колоній на агаризованих середовищах.

Actinomyces violaceus, *Actinomyces cellulosaе* і ще деякі актиноміцети приймають активну участь у розкладанні целюлози.

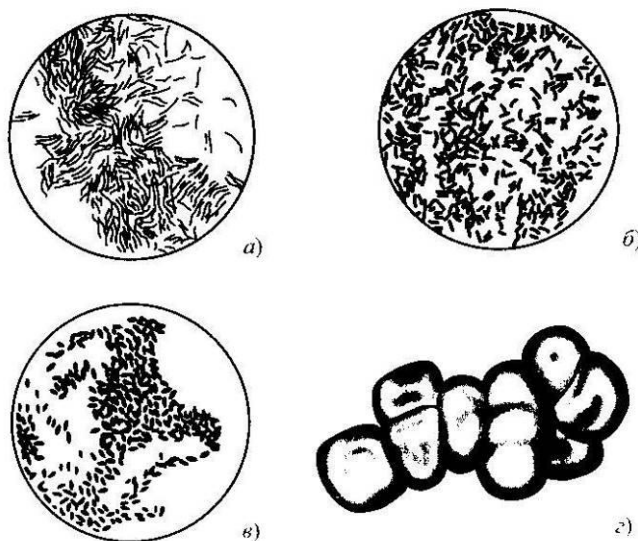
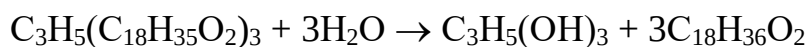


Рис. 1.2. Бактерії, що окислюють целюлозу:

а) *Cytophaga*; б) *Cellvibrio*; в) *Cellfalcicula*; г) плодові тіла *Polyangium* (Теппер, 2004)

Мікроорганізми, що здатні окислювати жири. Жири потрапляють у ґрунт із рослинними й тваринними залишками та клітинами мікроорганізмів. Мікроорганізми, що викликають трансформацію жирів в аеробних і анаеробних умовах, синтезують фермент ліпазу, що каталізує гідроліз жирів:

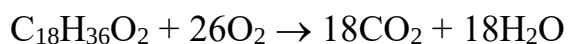


Тристеарин

Гліцерин

Стеаринова кислота

Продукти гідролізу жирів аеробні мікроорганізми надалі окислюють до двоокису вуглецю й води:



При виділенні та ідентифікації мікроорганізмів, вирощених на середовищах з жирами, можна виявити неспоронні палички *Pseudomonas fluorescens* (рис. 1.3) та *Pseudomonas stutzeri*, а іноді на таких середовищах розвиваються актиноміцети й молочна цвіль *Dipodascus geotrichum*.

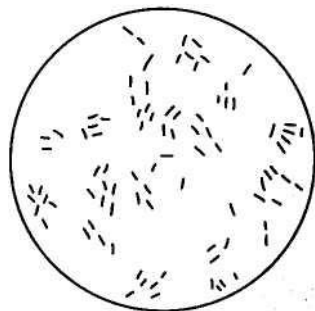


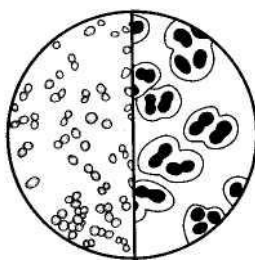
Рис. 1.3. *Pseudomonas fluorescens*, (Теппер, 2004)

Мікроорганізми, що здатні окислювати вуглеводні. Механізація сільськогосподарства призводить до забруднення сільськогосподарських угідь значною кількістю вуглеводнів. Так, гас і бензин, що використовуються в тракторних, автомобільних і інших двигунах, мазут і дизельне паливо, що застосовуються на сільських електростанціях, потрапляючи в ґрунт, призводять до погіршення його властивостей. Нафта і нафтопродукти характеризуються високим відсотком парафінових, нафтових і ароматичних вуглеводнів. У ґрунті є мікроорганізми, що здатні окислювати такі речовини. Вуглеводні добре окислюють представники родів *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*), *Mycobacterium*, *Arthrobacter* і *Nocardia*.

Вільно живучі азотфіксуючі бактерії. *Azotobacter chroococcum* – грамнегативна, мікроаерофільна бактерія, діазотроф. Клітини азотобактерій плеоморфні – від паличкоподібних до кокоподібних. Розташовуються поодинокі, парами (серед них часто зустрічаються диплококи), часто оточені слизовою капсулою, що легко визначити зробивши препарат з фарбуванням клітин фуксином і змішуванням з розведеною тушшю (рис. 1.4.). У середині клітин наявна зернистість.

Azotobacter vinelandii – облігатна аеробна бактерія, грамнегативний діазотроф. Має паличкоподібну морфологію з округленими кінцями. На щільних середовищах утворює сарциноподібні скупчення.

Колонії мікроорганізмів роду *Azotobacter* – темно-коричневого, майже чорного кольору. При культивуванні в рідких середовищах бактерії утворюють плівку, а на агарі і на гелевих пластинах – слизові колонії.



а) б)

Рис. 1.4. *Azotobacter chroococcum*:

а) на гелевих пластинах; б) забарвлені фуксином та тушшю (Теппер, 2004)

Методика виконання роботи

І. Засів живильних середовищ

1. Мікроорганізми, що зброджують целюлозу.

Для отримання накопичувальної культури мезофільних целюлозоруйнівних бактерій у велику пробірку з гумовою пробкою вносять 1 г вати або фільтрувального паперу, нарізаного смужками, і заливають на 2/3 середовищем наступного складу (г/дм³): (NH₄)₂HPO₄ – 2; KH₂PO₄ – 1; CaCl₂ – 0,3; MgSO₄ – 0,5; CaCO₃ – 5; пептон – 1.

Елективні умови в цьому випадку визначаються присутністю целюлози, як єдиного джерела вуглецю, що може споживатися тільки специфічними целюлозоруйнівними бактеріями, що мають фермент целюлазу, а також анаеробними умовами. Пептон, доданий до середовища в невеликій кількості, практично не порушує елективності середовища, але стимулює процес бродіння.

В середовище вносять невелику кількість ґрунту (1–2 г), доливають середовище практично до верху пробірки, щільно закривають гумовою пробкою і ставлять у термостат за +30–35°C.

Через 7–10 діб починається бродіння целюлози, що триває 2–3 тижні. Фільтрувальний папір в процесі зброджування поступово потроху ослизнюється, жовтіє й поступово руйнується.

2. Мікроорганізми, що окислюють целюлозу.

Мікроорганізми, що окислюють целюлозу, можна виявити методом Омелянського. Для цього в колбу Ерленмейєра на 100–150 см³ наливають 30 см³ живильного середовища, приготованого на водопровідній воді з 1 г/дм³ NH₄Cl та 0,5 г/дм³ K₂HPO₄. До живильного середовища додають 1–2 г досліджуваного ґрунту, занурюють у колбу із середовищем складчастий фільтр конусом нагору (висота фільтра не повинна перевищувати 3/4 висоти колби) і ставлять у термостат при +28–30°C. На межі між повітрям і середовищем на

целюлозі будуть розвиватися аеробні бактерії, що здатні руйнувати целюлозу. Папір поступово стає слизьким, місцями покривається жовтими плямами колоній мікобактерій.

3. Мікроорганізми, що здатні окислювати жири.

Для виділення жирокислювальних мікроорганізмів готують елективне мінеральне середовище, що спочатку не містить джерел вуглецю – середовище Рана (г/дм³ дистильованої води): K_2HPO_4 – 5; $CaCl_2$ – 1; $(NH_4)_3PO_4$ – 5; NaCl – декілька кристаликів; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1; $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ – декілька кристаликів.

Для виявлення та виділення жирокислювальних мікроорганізмів у велику пробірку (або можна використати колбу Ерленмейєра на 100 см³) наливають 30 см³ середовища і додають 1–2 г ґрунту. Як джерело вуглецю вносять шматочок розплавленого свинячого сала або яловичого жиру. Культури жирокислювальних бактерій і грибів можуть розвиватися також на рициновій або соняшниковій олії (1 мл олії в 30 см³ вищеведеного середовища). Інкують за +28°C. Протягом культивування жирокислювальних мікроорганізмів у прозорій касторовій олії утворюються білі пластівці нерозчинних у воді жирних кислот.

4. Мікроорганізми, що здатні окислювати вуглеводні.

Для одержання накопичувальної культури бактерій, здатних до окислення вуглеводнів, використовують приготоване на водопровідній воді середовище наступного складу (г/дм³): KNO_3 – 4; KH_2PO_4 – 0,6; Na_2HPO_4 – 0,6; $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ – 1,4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,8; рН середовища – 7,2–7,3. Як єдине джерело вуглецю в середовище додають 0,5 см³ гасу або вазелінового масла.

Для отримання та ідентифікації мікроорганізмів, здатних окислювати вуглеводні, у велику пробірку (або можна використати колбу Ерленмейєра на 100 см³) наливають 10 см³, насипають 1–2 г ґрунту, відібраного біля бензоколонки або гаража. Пробірки ставлять на качалку (100–120 об/хв) в термостатну кімнату при +30°C, на 4–6 діб.

5. Вільно живучі азотфіксуючі бактерії

Для одержання накопичувальної культури азотобактерій використовують рідке середовище Бейєринка (г/дм³ водопровідної води): маніт або глюкоза – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; $CaCO_3$ – 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; суміш мікроелементів за Федоровим – 1 см³.

У велику пробірку наливають 20 см³ рідкого середовища Бейєринка додають 1–2 г ґрунту. Пробірки ставлять у термостат за температури +28–30°C. Після 5–6 діб інкубування, за наявності азотобактерій, на поверхні середовища утвориться плівка.

II. Дослідження мікрофлори ґрунтів

Готують фіксовані в полум'ї пальника і забарвлені фуксином Циля препарати, які розглядають за допомогою світлового мікроскопу в імерсійній системі.

1. Мікроорганізми, що зброджують целюлозу.

Для дослідження мезофілів витягають пінцетом з нижньої частини пробірки шматочок паперу, який помітно розклався. Цей шматочок розмазують по предметному склу без додавання води. Мазок сушать звичайним способом, фіксують у полум'ї пальника й забарвлюють фуксином.

2. Мікроорганізми, що окислюють целюлозу.

Аеробні целюлозоруйнуючі бактерії розвиваються переважно на межі між повітрям і рідким середовищем, звідки і потрібно відібрати бактерії. Готують препарати колоній з різною морфологією, фіксують у полум'ї пальника й забарвлюють фуксином.

3. Мікроорганізми, що здатні окислювати жири.

Препарат готують, намагаючись захопити мікробіологічною петлею гідролізовані пластівці жиру з поверхні або із глибини культуральної рідини. Сушать його за кімнатної температури, фіксують сумішшю спирту з ефіром (1:1), що також призводить до видалення залишків жиру, а надалі забарвлюють фуксином.

4. Мікроорганізми, що здатні окислювати вуглеводні.

Для ідентифікації мікроорганізмів, що окислюють вуглеводні, з накопичувальної культури готують фіксований і пофарбований фуксином препарат.

5. Вільно живучі азотфіксуючі бактерії

Для визначення та опису вільноживучих азотфіксуючих бактерій готують фіксовані й пофарбовані фуксином препарати.

Оформлення результатів роботи

Протокол має складатися з опису методики виконання лабораторної роботи, наведення результатів, висновків.

Результати:

Звідки і коли відібрано зразок ґрунту: _____

Група мікроорганізмів, що визначали _____

Тривалість інкубування в елективних умовах _____

Характеристика змін, що відбулися в середовищі (на субстраті) тощо.

Короткий опис морфології колоній. Якщо їх утворилося декілька типів, то окремо наводиться опис кожного типу.

Замальовані результати мікроскопування препарату (препаратів) з вказуванням збільшення. За бажанням можна додати фото.

Короткий опис морфології клітин.

Висновки:

наводяться висновки щодо мікрофлори дослідженого зразку ґрунту в залежності від того, що це за ґрунт і звідки він був відібраний.

Контрольні запитання

1. Які мікроорганізми здатні зброджувати целюлозу та як відбувається цей процес?
2. За допомогою яких ферментів відбувається процес окислення целюлози та які мікроорганізми його здійснюють?
3. Які мікроорганізми здатні окислювати жири та як відбувається цей процес?
4. Які мікроорганізми здатні окислювати вуглеводні та як відбувається цей процес?
5. Які мікроорганізми є вільноживучими азотфіксаторами та як їх виділяють з ґрунту?
6. Яким чином створюються елективні умови для отримання накопичувальних культур мікроорганізмів?
7. Яким чином отримують препарати різних груп мікроорганізмів, проводять їх фарбування та мікроскопування?

ТЕМА 2. ПЕРЕРОБКА ВІДХОДІВ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА З ВИКОРИСТАННЯМ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Лабораторна робота 2

ПЕРЕРОБКА ВІДХОДІВ РОСЛИННИЦТВА З МЕТОЮ ОТРИМАННЯ КОРМОВОГО БІЛКУ

(3 заняття)

Мета роботи: ознайомлення з методами біодеструкції лігноцелюлозних відходів агропромислового комплексу (безпосередньо сільського господарства, переробної промисловості та лісового господарства) та набуття навичок виділення та аналізу кормового білку, отриманого шляхом культивування базидієвих грибів.

Короткі теоретичні відомості

Однією з сучасних світових проблем, що необхідно вирішувати є забруднення довкілля та негативний вплив на здоров'я населення, спричинені відходами різного походження. Відходи – будь-які речовини, матеріали і предмети, що утворилися у процесі виробництва чи споживання, а також товари (продукція), що повністю або частково втратили свої споживчі властивості і не мають подальшого використання за місцем їх утворення чи виявлення і від яких їхній власник позбувається, має намір або повинен позбутися шляхом утилізації чи видалення. Операції поводження з відходами включають збирання, перевезення, зберігання, сортування, оброблення (перероблення), утилізацію, видалення, знешкодження і захоронення відходів. Утилізація відходів – використання відходів як вторинних матеріальних чи енергетичних ресурсів.

Одним з масових видів відходів є рослинні, лігноцелюлозні відходи. До рослинних відходів належать відходи виробництва продукції сільського та лісового господарства, відходи виробництва харчових продуктів та напоїв, виробництва деревини, одягу, паперу тощо. Зокрема, це:

- рослинні відходи сільського господарства жирнокислотних – компоненти сільськогосподарських культур (солома, бадилля овочеве, качани кукурудзи тощо);
- відходи виробництва деревини (тирса деревних порід, деревна стружка та обрізки тощо);
- відходи виробництва харчових продуктів та напоїв (лушпиння соняшника, лузга і висівки зернових культур, багаса сорго, сухарна крихта, молочна сироватка, барда, меляси тощо).

Переробка рослинних відходів може здійснюватися наступними методами: механічним, хімічним та біологічним (силосування, компостування, біоконверсія).

Лігноцелюлозні відходи, що утворюються в результаті виробництва продукції сільського та лісового господарства, виробництва продуктів харчових, паперу та інших галузей промисловості є важкодоступними для швидкого мікробного розкладання в природних умовах, тому накопичуються у великих кількостях, забруднюють навколишнє середовище і являють серйозну екологічну проблему. У зв'язку з цим, останніми роками інтенсивно розробляються нові напрями біотехнології переробки лігноцелюлозних відходів, при цьому велика увага приділяється дереворуйнівним базидієвим грибам. Відомо, що ці гриби мають ефективну ферментну систему, за допомогою якої розкладають полісахаридні і лігнінові компоненти субстрату. Крім того, що біоконверсія рослинних відходів призводить до отримання гумусових речовин, які забезпечують родючість ґрунту, використання їстівних грибів дає змогу отримувати білкову кормову масу. В результаті біодеструкції лігноцелюлозні субстрати трансформуються в біомасу з підвищеною біологічною, поживною та енергетичною цінністю, високим вмістом амінокислот, вітамінів, мінеральних речовин, мікроелементів і білка.

Грибами, що можуть використовуватися для проведення біоконверсії рослинних відходів є лігнотрофні базидіоміцети, які переважно належать до порядку *Polyporales* та *Agaricales* і мають або гарні поживні і смакові якості (*Pleurotus ostreatus* (глива), *Lentinula edodes* (шіітаке), *Grifola frondosa* (грифола кучерява), *Flammulina velutipes* (опеньок зимовий), *Laetiporus sulphureus* (трутовик сірчано-жовтий) тощо, або біомаса яких може бути джерелом сполук з лікувально-профілактичними властивостями (*Ganoderma lucidum*, *Cerioporus squamosus*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor* тощо).

Незалежно від того, з якою метою проводиться культивування штами повинні характеризуватися високою швидкістю росту міцелію, значною конкурентоспроможністю до сторонньої мікрофлори, здатністю утилізувати лігноцелюлозні субстрати та можливістю використання субстрату після збору плодових тіл грибів в якості корму для тварин або добрив, чи бути сировиною для отримання біологічно-активних речовин.

Першим етапом створення біотехнології утилізації лігноцелюлозних відходів є дослідження грибів в природних умовах, їх виділення та отримання чистої культури. Існують різноманітні методи виділення базидієвих грибів у чисту культуру: з шматочків різних частин плодових тіл, з міцелію або з спор. В залежності від особливостей будови та фізіології грибів і обирається певний метод. Наприклад, плодові тіла *G. frondosa*, *L. sulphureus*, *P. ostreatus*,

C. squamosus великі та м'ясисті, тому чисту культуру з них отримують з шматочків базидіюм. Чисту культуру з базидієвих грибів, що мають невеликі або сухі базидіюми (*G. lucidum*, *S. commune*, *T. versicolor*) виділяють як з плодових тіл, зібраних з різних природних субстратів, так і з спорового матеріалу.

Наступним етапом досліджень є безпосередньо культивування базидієвих грибів спочатку на агаризованих, а потім на рідких середовищах та твердих субстратах.

Агаризовані середовища можуть мати різноманітний склад. Для підтримування чистих культур у життєздатному стані та виконання різноманітних досліджень культурально-морфологічних особливостей лігнотрофних базидіюміцетів використовують натуральні, синтетичні та комплексні агаризовані живильні середовища. При цьому перевага надається таким компонентам, як пивне сусло, мальт-екстракт, пептон, дріжджовий екстракт, глюкоза, декстроза, відвар картоплі тощо.

Для посіву дереворуйнівних грибів на тверді субстрати застосовують попередньо вирощений на агаризованих середовищах міцелій або шматочки плодових тіл. Але для пришвидшення заростання грибом цільового субстрату краще використовувати фізіологічно активнішу міцеліальну суспензію гриба, вирощеного в умовах глибинної культури. При цьому застосовують різноманітні середовища, що містять пивне сусло, пептон, дріжджовий екстракт, кукурудзяний екстракт, цукри, неорганічні солі, домішки з ростовими факторами різного походження тощо. Як рідке живильне середовище для культивування міцелію також можна використовувати суспензію сухарної крихти з концентрацією 50 г/дм³, барду, меляси чи молочну сироватку. Ці живильні середовища містять легкодоступні вуглеводи та необхідні вітаміни, є легкодоступними та дешевими відходами. Глибинне культивування також є ефективнішим, якщо метою культивування базидієвого гриба є отримання екзо- та ендогенних біологічно-активних сполук різноманітного призначення.

Склад та кількість компонентів агаризованих, рідких, твердофазних живильних середовищ залежить від виду гриба та мети культивування.

Для вирощування базидієвих лігнотрофних грибів з метою отримання кормового білкового продукту, можуть бути застосовані безпосередньо лігноцелюлозні відходи: солома пшениці, жита, ячменя, качани й стебла кукурудзи, лушпиння соняшникового насіння, тирса листяних порід дерев тощо (рис. 2.1.). Крім того, для підвищення поживних властивостей як субстрату, так і харчової цінності для тварин, до нього додають патоку, висівки, плодови та овочеві шкірки, а також, для покращення якості плодових тіл грибів, відповідні домішки мінеральних солей калію, натрію, кальцію, фосфору, тощо. При

проведенні твердофазного культивування базидіоміцетів контролюється температура, вологість, освітлення та відсутність контамінації.

Практичне значення та умови культивування для різних видів лігнотрофних базидіоміцетів наводяться нижче. Зауважимо, що умови культивування дереворуйнівних базидієвих грибів відрізняються на різних стадіях життєвого циклу. Переважно, для росту міцелію необхідні певні вологість, температура та відсутність освітлення, а для формування базидіом – прохолодніші умови і обов'язкова наявність освітлення.

Ganoderma lucidum

Неїстівний, неотруйний. Джерело отримання терпеноїдів, імуномодулювальних білків, полісахаридів. Підвищує імунітет, має антибактеріальну, противірусну, протипухлинну активність, покращує діяльність серцево-судинної, видільної, статевий, нервової та дихальної систем організму.

Як субстрати при проведенні твердофазного культивування використовуються суміші з тирси листяних порід дерев – дуб, клен, бук, в'яз, а також лушпиння соняшника, солома, з додаванням зерна, висівки, крейди, гіпсу. Умови вирощування міцелію: +25–28°C, вологість 65–75%, в темряві. Умови отримання плодових тіл: +18–21°C, вологість 90–95%, освітлення.

Grifola frondosa

Їстівний, має лікувально-профілактичне значення. Джерело отримання глюканів та глюкано-протеїнових комплексів (грифолан, грифрон) з протипухлинною, імуномодулювальною, холестеринзнижувальною, гепатопротекторною та ін. дією.

Основою твердофазних субстратів є тирса листяних порід дерев – бук, дуб, клен, в'яз, рідше – вільха, тополя, а також лушпиння соняшника, солома. До основи зазвичай додають висівки, борошно, розчини солей, гіпс, тощо. Умови вирощування міцелію: +21–24°C, вологість 65–75%, в темряві. Умови формування примордій: +10–15°C, вологість 95%, освітлення. Умови для розвитку плодових тіл: +13–16°C, вологість 75–85%, освітлення.

Laetiporus sulphureus

Їстівний, має лікувально-профілактичне значення. Джерело отримання ксантофілів, лектинів, тощо.

Як твердофазні субстрати використовуються суміші з тирси листяних порід дерев – дуб, клен, бук, в'яз, а також лушпиння соняшника, солома, зерно. До основи часто додають висівки, крейду, гіпс. Умови вирощування міцелію: +25–28°C, вологість 65–75%, в темряві. Умови отримання плодових тіл: +18–21°C, вологість 90–95%, освітлення.

Lentinula edodes

Їстівний, має лікувально-профілактичне значення. Джерело отримання глюкану (лентинан) з протипухлинною, імуномодулювальною та іншою лікувально-профілактичною дією.

Субстратами, що застосовують для твердофазного культивування є суміші тирси листяних порід дерев – дуб, клен, бук, в'яз, а також лушпиння соняшника, солома, зерно, гребні та вичавки винограду. До основи часто додають висівки, крейду, гіпс. Умови нарощення міцелію: +25–28°C, вологість 65–75%, в темряві. Умови отримання плодових тіл: +13–16°C (холодолюбні штами), +18–21°C (теплолюбні штами), вологість 90–95%, освітлення.

Pleurotus ostreatus

Їстівний, має лікувально-профілактичне значення. Джерело отримання харчового білку.

Як твердофазні субстрати використовуються суміші з тирси листяних порід дерев – дуб, клен, бук, в'яз, а також лушпиння соняшника, солома, зерно. До основи часто додають крейду, гіпс.

Умови нарощення міцелію: +24–28°C, вологість 95–100%, в темряві. Умови отримання плодових тіл: +14–18°C, вологість 75–85%, освітлення. Для деяких штамів для формування примордій необхідним є проведення холодового шоку (+0–2°C) протягом 1–2 діб.

Cerionoporus squamosus

Їстівний, має лікувально-профілактичне значення.

Як субстрати використовуються суміші тирси листяних порід дерев – дуб, клен, бук, в'яз, а також лушпиння соняшника, солома, зерно. Можна додавати висівки. Умови нарощення міцелію: +25–28°C, вологість 65–75%, в темряві. Умови отримання плодових тіл: +18–21°C, вологість 90–95%, освітлення.

Schizophyllum commune

Умовно їстівний (плодові тіла жорсткі, проте вживаються в їжу в тропічних країнах). Джерело отримання глюкану (шизофілан) з протипухлинною, імуномодулювальною, гепатопротекторною, протизапальною та інш. дією.

Є термофілом, ксерофітом та має здатність до росту на широкому колі субстратів та середовищ. Тому для культивування можна використовувати різноманітні лігноцелюлозні субстрати, в тому числі тирсу хвойних дерев. Умови нарощення міцелію: +30–35°C, вологість 60–70%, в темряві. Умови отримання плодових тіл: +25–30°C, вологість 70–75%, освітлення.

Trametes versicolor

Неїстівний, неотруйний. Джерело отримання пептидоглюканів (крестин (PSK) та PSP) та полісахариду коріолану. Препарати з *Trametes versicolor* мають наступні лікувальні властивості: антивірусну, антибактеріальну, гепатопротекторну, імуномодулювальну, протипухлинну.

Як субстрати використовуються більшість широколистяних порід дерев (дуб, вільха, тополя, осика, в'яз та евкаліпт). Це один з небагатьох грибів, що добре ростуть на деревині фруктових порід дерев (яблуня, вишня та інш.). Для культивування також можна використати бурякову мелясу, екстракт з виноградних вичавок, кон'ячну барду.

Умови нарощування міцелію: +24–29°C, вологість 90–100%, в темряві. Умови отримання плодових тіл: +18–24°C, вологість 95%, освітлення.

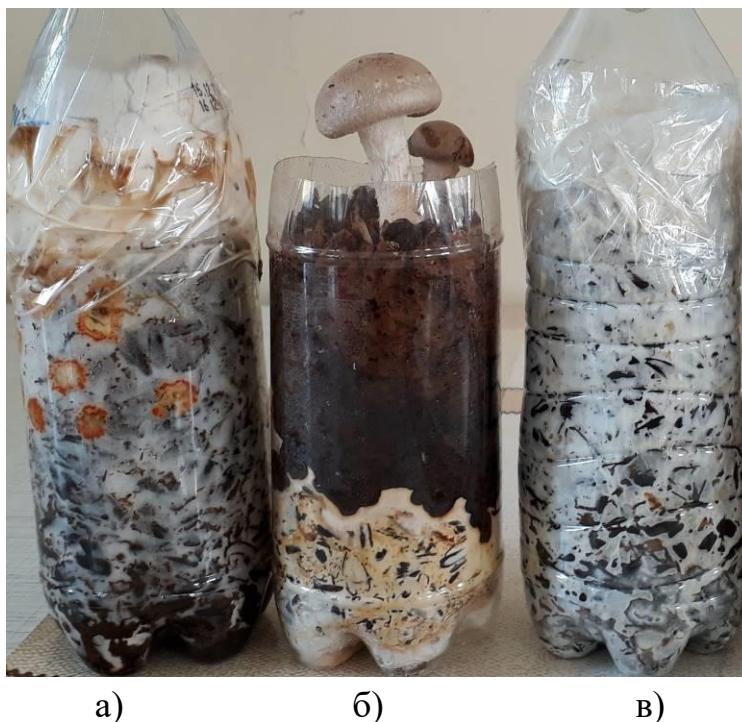


Рис. 2.1. Базидієві дереворуйнівні гриби на лігноцелюлозних відходах (лушпиння насіння соняшника з додаванням тирси різних порід дерев в залежності від виду гриба)

а) *Laetiporus sulphureus*; б) *Lentinula edodes*; в) *Pleurotus ostreatus*

В результаті твердофазного культивування дереворуйнівних базидієвих макроміцетів, відбувається біоконверсія лігноцелюлозних відходів і отримується кормовий продукт, що містить грибний білок, амінокислоти, ліпіди, мікроелементи, вітаміни, різноманітні легкозасвоювані вуглеводи тощо. При цьому кількості важкозасвоюваних для свійських тварин речовин (лігнін, целюлоза та інш.) значно зменшені.

Методика виконання роботи

I. Отримання посівного міцелію (інокулюму) культур базидієвих грибів

Інокулюм, призначений для засіву у твердофазні субстрати краще отримувати глибинним культивуванням. В свою чергу, суспензію міцелію гриба для інокуляції отримують з музейної культури (чиста культура штаму на агаризованому середовищі, що зберігається за +4°C). Для цього з пробірки (або чашки Петрі) з чистою культурою базидієвого гриба на агаризованому середовищі гачком асептично переносять маленькі шматочки міцелію (зазвичай 5–10 шматочків) в колбу з відповідним стерильним рідким живильним середовищем (табл. 2.1).

Засіяні колби спочатку залишають на 2–3 доби при +27–28°C, а потім переставляють на орбітальний шейкер (качалку) з оптимальними для даного виду базидієвого макроміцету частотою перемішування та температурою. Нарощування посівного матеріалу триває до 7 діб.

Таблиця 2.1. Умови культивування та склад рідких живильних середовищ для отримання посівного матеріалу різних видів дереворуйнівних базидієвих макроміцетів

Вид гриба	Температура, °C	Частота обертів качалки, об/хв	Склад живильного середовища*, г/дм ³	pH
<i>Ganoderma lucidum</i>	+27–28	150–155	NH ₄ NO ₃ – 3; KH ₂ PO ₄ – 1; K ₂ HPO ₄ – 1; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5; глюкоза – 20; пептон – 3; екстракт кормових дріжджів – 5	6,0–6,2
<i>Grifola frondosa</i>	+27–28	100–120	NH ₄ NO ₃ – 4; KH ₂ PO ₄ – 1; K ₂ HPO ₄ – 1; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5; глюкоза – 50; пептон – 10	6,0–6,5
<i>Laetiporus sulphureus</i>	+27–28	120–150	NH ₄ NO ₃ – 3; KH ₂ PO ₄ – 1; K ₂ HPO ₄ – 1; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,005; ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,005; CuSO ₄ – 0,003; MnSO ₄ ·4H ₂ O – 0,005; глюкоза – 15; соєве борошно – 10	6,5

Вид гриба	Темпе- ратура, °C	Частота обертів качалки, об/хв	Склад живильного середовища*, г/дм ³	pH
<i>Lentinula edodes</i>	+27–28	150–155	NH ₄ NO ₃ – 3; KH ₂ PO ₄ – 1; K ₂ HPO ₄ – 1; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5; глюкоза – 20; пептон – 3; екстракт кормових дріжджів – 5	6,0–6,2
<i>Pleurotus ostreatus</i>	+27–28	150–155	NH ₄ NO ₃ – 3; KH ₂ PO ₄ – 1; K ₂ HPO ₄ – 1; MgSO ₄ ·3H ₂ O – 0,5; глюкоза – 20; пептон – 3; екстракт кормових дріжджів – 5	6,0–6,2
<i>Cerioporus squamosus</i>	+27–28	120–150	NH ₄ NO ₃ – 3; KH ₂ PO ₄ – 1; K ₂ HPO ₄ – 1; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5; FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,005; ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,005; CuSO ₄ – 0,003; MnSO ₄ ×4H ₂ O – 0,005; глюкоза – 15; соєве борошно – 10; пивне сусло (8 ° за Балінгом) – 5 см ³	6,5
<i>Schizophyllum commune</i>	+30–31	170–180	NH ₄ NO ₃ – 3; KH ₂ PO ₄ – 1; K ₂ HPO ₄ – 1; MgSO ₄ ·3H ₂ O – 0,6; глюкоза – 30; м'яса або пептон – 10	5,3–5,5
<i>Trametes versicolor</i>	+29–30	145–150	KH ₂ PO ₄ – 1; K ₂ HPO ₄ – 1; MgSO ₄ – 0,25; екстракт кормових дріжджів – 3; глюкоза – 20; пептон – 3; пивне сусло (8 ° за Балінгом) – 20 см ³	5,0–5,5

* – усі середовища готуються на дистильованій воді; термолабільні компоненти автоклавуються окремо і після охолодження асептично додаються до стерильної сольової основи (агаризованої або без агару)

II. Інокуляція рослинних субстратів культурами базидієвих лігнотрофів

Попередньо готуються компоненти твердофазного субстрату: дозуються, стерилізуються (автоклавуванням або кип'ятінням), охолоджуються, змішуються. З приготованого простерилізованого субстрату відбирається 30 г та залишається для подальших досліджень.

Біоконверсію лігноцелюлозних субстратів в лабораторних умовах можна здійснювати у щільних поліетиленових пакетах або у пластикових бутілях з ватяно-марлевою пробкою. Переважно використовувані обсяги ємностей: 0,2–2,0 дм³. Бутілі попередньо оброблюють дезінфектантом (етанол 70–96%, засоби на основі хлору (наприклад, гіпохлорит 0,1%) тощо). Далі приготований субстрат шарами засипають в ємності, перемежуючи невеликими кількостями інокулюму певного базидіоміцету. Засіяні ємності ставляться в термостат за температури, оптимальної для даного виду (штаму). Культивування здійснюють до повного обростання субстрату. В залежності від складу та загальних обсягів лігноцелюлозного субстрату, виду і штаму гриба тривалість обростання може складати від 10 до 30 діб.

III. Дослідження ефективності біоконверсії рослинних субстратів

Дослідження вмісту білку, вільних амінокислот та лігніну проводять в завчасно відібраному вихідному субстраті та в грибній біомасі з залишками субстрату після біоконверсії. Обов'язково визначають та враховують вологість вихідного субстрату та продукту біоконверсії. Вологість визначають ваговим методом, тобто висушуванням при $+105 \pm 2$ °C зразків вихідного субстрату та продуктів біоконверсії (по 3–5 г) в алюмінієвих бюксах.

1. Визначення вмісту білку

Вміст білку визначають в двох зразках: у вихідному субстраті та в грибній біомасі з залишками субстрату після біоконверсії. Наважку зразка $2 \pm 0,01$ г максимально подрібнюють ножицями або ножом і кладуть у велику пробірку. Додають 20 см³ 0,5 М NaOH, добре перемішують і кип'ятять 15 хвилин на водяній бані. Охолоджують, фільтрують через паперовий фільтр, відбирають фільтрат для визначення білку.

Для визначення білку використовують метод Лоурі. Для цього в пробірку наливають 0,4 см³ досліджуваного розчину (якщо отриманий екстракт дуже забарвлений, то його попередньо розводять в 5-10 разів, або беруть 0,1 см³ екстракту та 0,3 см³ дистильованої води), додають 2 см³ реактиву III, який складається з 50 см³ розчину I (2% розчин карбонату натрію, приготований на 0,1н NaOH) та 1 см³ розчину II (0,5% розчин CuSO₄, приготований на 1% розчині цитрату натрію) та залишають за кімнатної температури на 10 хв. Після чого доливають 0,2 см³ реактиву Фоліна-Чокальтеу, розведеного перед застосуванням дистильованою водою (1 : 1), перемішують та залишають на 30 хвилин. Через 30 хв вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 750 нм в кюветі 5 мм.

Концентрацію білку визначають за калібрувальним графіком, побудованим в межах 10–200 мг/см³ білку.

2. Визначення вмісту вільних амінокислот

Вміст вільних амінокислот також визначають в двох зразках: у вихідному субстраті та в грибній біомасі з залишками субстрату після біоконверсії. Наважки по 0,5 г окремо подрібнюють ножицями або ножом в ступку, додають 10 см³ 75% розчину етилового спирту, нагрітого на водяній бані до температури +60–70 °С. Суміш старанно розтирають протягом 2–3 хв., додають ще 10 см³ етанолу та фільтрують крізь складчастий паперовий фільтр у чашку для випарювання. З фільтрату повністю випарюють спирт на водяній бані за температури +60–70 °С. До отриманого сухого залишку додають 1 см³ розчину HCl 0,1 N і старанно розтирають скляною паличкою протягом 2–3 хв. З випарної чашки кислотний розчин амінокислот кількісно переносять у склянку з мітками на 25 та 100 см³. Для цього ополіскують випарну чашку дистильованою водою два – три рази, порціями по 5–6 см³ і доводять загальний об'єм екстракту в склянці до 25 см³. До суміші амінокислот у склянці додають 1 г BaCl₂ і перемішують 2 хв. Потім доводять дистильованою водою об'єм до 100 см³ і при наявності осаду фільтрують крізь складчастий паперовий фільтр від фосфорнокислих і вуглекислих солей барію. Далі готують дві колби на 100 см³. У одну вливають 20 см³ фільтрату, в другу – 20 см³ дистильованої води. Потім в обидві колби додають по 10 крапель розчину фенолфталеїну і по 10 см³ нейтральної формольної суміші і титрують з бюретки розчином NaOH 0,05 М до появи ледь помітного рожевого забарвлення. Кольори контролю і обох проб повинні бути однаковими. Масову концентрацію вільних амінокислот (мг/(г зразка)) обчислюють за формулою:

$$C = \frac{(A - B) \cdot f \cdot q}{V},$$

де: А, В – об'єми NaOH, витрачені на титрування проби і контролю (см³); f – коефіцієнт поправки на титр NaOH; q – концентрація NaOH (мг/см³); V – об'єм розчину амінокислот, взятого на аналіз (см³).

Враховують вологість досліджуваного матеріалу.

3. Визначення кількості лігніну в субстраті.

Вміст лігніну також визначають в двох зразках: у вихідному субстраті та в грибній біомасі з залишками субстрату після біоконверсії.

Дослід передбачає користування концентрованою сірчаною кислотою, тому його необхідно проводити особливо обережно, в гумових рукавичках, під витяжною шафою, з дотриманням правил безпеки!

Наважку 0,2 г подрібнюють ножицями або ножом та переносять в велику пробірку. Дуже обережно в пробірку з подрібненою наважкою додають

4 см³ 72% сірчаної кислоти, закривають пробкою з кислотостійкого матеріалу і витримують 10 хвилин постійно обережно струшуючи. Після цього кислотний екстракт обережно переливають в іншу термо-, кислотостійку пробірку, куди попередньо налили 5 см³ дистильованої води, та кип'ятять на водяній бані протягом 40 хв. Після кип'ятіння проводять фільтрування крізь попередньо зважений кислотостійкий паперовий фільтр з одночасним промиванням дистильованою водою до нейтрального рН. Фільтр з промитим лігніном висушують при +105±2 °С та зважують. Розраховують вміст лігніну (мг/(1 г сухої маси)) у вихідному субстраті та в грибній біомасі з залишками субстрату після біоконверсії.

Оформлення результатів роботи

Протокол має складатися з опису методики виконання лабораторної роботи, наведення результатів, висновків.

Результати:

Вид і штам базидієвого гриба: _____

Гриб викликає білу гниль деревини/ буру гниль деревини / інше

Фото базидіоми з джерел літератури/інтернету з обов'язковим посиланням на джерело: ...

Агаризоване середовище, на якому зберігається штам: _____

Рідке середовище для отримання інокулюма: _____

Умови і тривалість культивування інокулюму: _____

Склад субстрату для твердофазного культивування: _____

Опис ємності і кількості субстрату для біоконверсії: _____

Умови і тривалість біоконверсії: _____

Характеристика вихідного лігноцелюлозного субстрату та продукту біоконверсії (грибної біомаси з залишками субстрату):

Параметр	Субстрат	Білковий кормовий продукт
Вологість		
Вміст білку		
Вміст вільних амінокислот		
Вміст лігніну		

Висновки:

наводяться висновки щодо результатів біоконверсії лігноцелюлозних субстратів базидієвими дереворуйнівними грибами.

Контрольні запитання

1. Що таке відходи?
2. Які типи відходів утворюються у сільськогосподарському виробництві?

3. Наведіть приклади виробництв, в результаті яких утворюються рослинні відходи.
4. Чому важливо утилізувати лігноцелюлозні відходи?
5. В чому переваги використання для біоконверсії рослинних відходів лігнотрофних базидіоміцетів?
6. Яким чином утилізують відходи сільськогосподарського виробництва?
7. Які продукти можна отримати в результаті біоконверсії рослинних відходів лігнотрофними базидієвими грибами?
8. Наведіть умови отримання посівного матеріалу базидіоміцетів на відходах рослинного походження.
9. Які рідкі живильні середовища можна використовувати для приготування посівного міцелію культур базидієвих грибів?
10. Наведіть умови проведення твердофазного культивування базидіоміцетів на відходах рослинного походження.
11. Які процеси відбуваються при біоконверсії лігноцелюлозних відходів лігнотрофними базидіоміцетами?

Лабораторна робота 3

БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ КОРМІВ СИЛОСУВАННЯМ

(2 заняття)

Мета роботи: оволодіння навичками аналізу мікробіологічних та біохімічних показників силосу як продукту біотехнології.

Короткі теоретичні відомості

Силосування – консервування кормової маси без доступу повітря, що є найпоширенішим способом заготівлі соковитих кормів.

Мета силосування

- пригнічення небажаної та патогенної мікрофлори;
- підвищення харчової цінності та органолептичних показників;
- збільшення строків зберігання рослинних кормів.

Основні етапи силосування:

1. скошування або збирання рослин;
2. подрібнення рослинної біомаси;
3. завантаження в силосні споруди;
4. ущільнення та укриття;
5. силосування.

Основним біохімічним процесом при силосуванні є молочнокисле бродіння. Молочнокислі бактерії зброджують вуглеводи рослин, що силосуються, у молочну й, частково, в оцтову кислоти, які пригнічують розвиток гнильних, маслянокислих і інших бактерій, що можуть погіршувати якість кормів.

Для забезпечення нормального розвитку молочнокислих бактерій у процесі силосування необхідний достатній вміст цукру та волоgi в рослинах, що силосуються і анаеробні умови. Цвілеві гриби витримують сильне підкислення, але є суворими аеробами, тому в добре спресованому, закритому від доступу повітря, заквашеному кормі розмножуватися не можуть.

Під час бродіння, в результаті розкладання вуглеводів, збільшується кількість органічних кислот. В результаті силосування молочнокислі бактерії знижують рН субстрату до 4,2–4,0. Якщо рН силосу з тої або іншої причини стає вищим за 4,7, то створюються умови, сприятливі для розвитку інших мікроорганізмів, що призводить до погіршення якості і термінів зберігання корму, оскільки у ньому накопичуються масляна кислота, аміни, аміак і інші продукти. Однак зниження рН залежить не тільки від утворення молочної й оцтової кислот, але й від буферності рослинного матеріалу, обумовленої присутністю білків, солей. Тому, незважаючи на накопичення кислот, рН середовища майже не знижується доти, доки не буде витрачено всі сполуки, що забезпечують буферність рослинної сировини. Зв'язані буферними речовинами кислоти утворюють у силосі запас так званих зв'язаних кислот.

Буферність розтертої рослинної маси визначають титруванням за кількістю 0,1 М розчину молочної кислоти, необхідної для доведення рН до 4,0. Оскільки на утворення молочної кислоти витрачається приблизно 60% цукрів корму, то, розрахувавши 100%, визначають так званий *цукровий мінімум даної рослинної сировини*, тобто найменшу кількість цукру, необхідну для утворення такої кількості молочної й оцтової кислот, що може змістити рН до 4,0. Рослини добре силосуються, якщо в них багато цукру, а цукровий мінімум невеликий. Якщо фактичний вміст цукру в рослинній сировині приблизно дорівнює цукровому мінімуму, то вони силосуються погано і найменше відхилення в процесі силосування призводить до псування корму. Якщо фактичний вміст цукру менше цукрового мінімуму, то рослини зовсім не силосуються. Велика кількість вуглеводів, що легко гідролізуються, також призводить до зниження якості силосу із-за розвитку дріжджів та утворення спирту. Рослинна сировина поділяється на таку, що легко силосується (кукурудза, сорго, соняшник, однорічні та багаторічні трави, коренеплоди та їх бадилля), таку, що важко силосується (бобові, бадилля картоплі) та не силосується (кропива, бадилля томатів, гарбуза).

Загалом, якісний силос характеризується наступними показниками: колір – оливково-зелений (може трохи варіювати), запах – приємний (мочених яблук, печеного хліба), рН = 4,0–4,2, загальна кислотність – 2–2,5% (у перерахунку на молочну кислоту), вологість – 70%. Мікрофлора якісного силосу представлена молочнокислими паличками і лактококами, часто в невеликих кількостях наявні дріжджі. Останні утворюють ефірні речовини, що надають силосу приємний запах, і збагачують корм білком і вітамінами. Однак у великих кількостях дріжджі погіршують якість силосу, знижуючи його кислотність, а також вони є конкурентами молочнокислих бактерій у споживанні цукру.

Для дослідження мікрофлори силосу застосовують загальноприйняті в мікробіології та біотехнології методи та засоби. Для визначення мікробного складу силосу проводять висіви на елективні середовища (табл. 3.1) та визначають наявність або відсутність певних груп мікроорганізмів як корисних, так і шкідливих для силосу і для тварин, що його вживатимуть.

Таблиця 3.1. Живильні середовища, що застосовуються при дослідженні силосу

Середовище	Назва	Склад та особливості приготування	Для визначення яких мікроорганізмів призначене
1.	Капустяний агар із крейдою	Капустяний відвар – 900 см ³ , дріжджовий екстракт – 100 см ³ , пептон – 10 г, глюкоза – 20 г, ацетат натрію – 3,35 г, MnSO ₄ – 0,025 г, агар – 15–20 г. Стерильну крейду додають у колби з розрахунку 5 г на 200 см ³ середовища. Стерилізують при 0,5 атм 30 хв.	молочнокислі бактерії
2.	Сусло-агар зі стрептоміцином (СА+Str)	Сусло, розведене до 3° за Балінгом – 1 дм ³ , агар – 20 г. Стерилізують при 0,5 атм 30 хв. Перед розливанням середовища в чашки Петрі в сусло-агар додають стрептоміцин у кількості 80–100 одиниць на 1 см ³ середовища	мікроміцети, макроміцети, дріжджі
3.	Картопляне середовище із крейдою	У пробірки вносять стерильну крейду (на кінчику скальпеля), 8–10 кубиків сирії картоплі величиною 2–3 мм, заливають водопровідною водою до 3/4 обсягу пробірок. Стерилізують при 1 атм 30 хв	маслянокислі бактерії

Середовище	Назва	Склад та особливості приготування	Для визначення яких мікро-організмів призначене
4.	М'ясо-пептонний агар (МПА)	Готується у відповідності до пропису на упаковці. Стерилізують при 0,5 атм 30 хв	загальна кількість бактерій
5.	Середовище Ендо	Готується у відповідності до пропису на упаковці. Стерилізують при 0,5 атм 30 хв	бактерії групи кишкової палички

Методика виконання роботи

І. Визначення кислотності силосу та засів живильних середовищ

Для аналізу силосу з торцевої частини траншеї, ями або буртів беруть середню пробу силосу. Для цього знімають стерильним ножем верхній шар, вирізають кубики по середній лінії бурту з інтервалом в 1 м. Відібраний силос складають у стерильну скляну банку на 0,5–2 дм³ із притертою пробкою так, щоб силос був покладений щільно й доверху. Проби перемішують у стерильному кристалізаторі, подрібнюють стерильними ножицями й беруть наважку для аналізів. Дослідження проводять не пізніше 1 години після узяття проби.

Узагальнену схему дослідження силосу наведено в Додатку А.

1. Визначення кислотності силосу

Наважку силосу (5 г) розтирають у ступці й переносять у колбу на 250 см³. Додають 50 см³ дистильованої води, закривають гумовою пробкою й ретельно перемішують. Витримують 30 хв, після чого в іншу конічну колбу відбирають 10 см³ змиву, додають 20 см³ дистильованої води і титрують 0,1 М розчином NaOH у присутності фенолфталеїну до появи стійкого рожевого забарвлення.

Загальний вміст кислоти в силосі у перерахунку на молочну кислоту виражають у %: 1 см³ 0,1 М розчину NaOH відповідає 0,009 г молочної кислоти.

2. Дослідження якісного складу мікрофлори силосу

Для визначення загальної якості мікрофлори силосу з нього готують препарат. Для цього пінцетом беруть невелику кількість силосу і щільно притискають його до предметного скла без додавання води так, щоб на склі

залишився відбиток. Препарат сушать на повітрі, фіксують у полум'ї і забарвлюють метиленовим синім (2–3 хв) або фуксином. Препарат мікроскопують в імерсійній системі.

На препараті якісного силосу повинні бути наявні тонкі неспороутворювальні палички різного розміру (молочнокислі бактерії) і коки (молочнокислі лактококи). Зазвичай переважають *Lactobacillus plantarum* - гомоферментативні мезофільні короткі палички, що часто розташовані паралельними рядами. Також в препараті можуть зустрічатися клітини дріжджів, що брунькуються. Спороутворювальні бактерії виявляються рідко. У неякісному силосі на препараті часто наявні спороутворювальні палички (маслянокислі бактерії, аеробні гнильні бактерії), а також цвілеві гриби.

3. Кількісний облік мікроорганізмів у силосі

Наважку силосу (5 г) вносять у колбу з 50 см³ стерильної водопровідної води. Колбу збовтують круговими обертовими рухами протягом 8–10 хв.

З отриманого змиву відбирають 0,5 см³ суспензії в пробірку з 4,5 см³ стерильної води. Потім готують розведення в 100 разів, перенесенням стерильною піпеткою 0,05 см³ рідини в пробірку з 5 см³ стерильної води.

Потім проводять посів з відповідних розведень на елективні середовища: по 0,1 см³ суспензії – для глибинного посіву та по 0,05 см³ суспензії – для поверхневого.

Визначення молочнокислих бактерій проводять глибинним посівом в товщу *капустяного агару із крейдою* (середовище 1). Для цього у теплий (не гарячий) капустяний агар, який ще не застиг, вносять 0,1 см³ суспензії, перемішують та виливають капустяний агар у чашку Петрі. Дають застигнути, інкубують при +36°C. Навколо колоній молочнокислих бактерій внаслідок накопичення молочної кислоти утворюються прозорі зони розчинення крейди. Кількість колоній молочнокислих бактерій на капустяному агарі із крейдою підраховують на 2–6 добу.

Мікроскопічні гриби і дріжджі визначають на *сусло-агарі зі стрептоміцином* (середовище 2) поверхневим посівом. Інкубують при +28°C. Підрахунок колоній проводять на 3–4 добу, за необхідності повторно на 7–8 добу.

Наявність маслянокислих бактерій встановлюють на *картопляному середовищі* (середовище 3). Для виявлення маслянокислих бактерій виконують посів із суспензії після її пастеризації протягом 10 хв при +75°C. Облік ведуть через 6–7 діб, за інтенсивністю виділення газу (шматочки картоплі спливають).

Загальну кількість мікроорганізмів визначають, висіваючи суспензію на *МПА* (середовище 4). Аналізування та підрахунок різних типів колоній проводять на 24 і на 48 год інкубування.

Бактерії групи кишкової палички визначають на *середовищі Ендо* (середовище 5). Чашки після висіву інкубують 48 год при +36°C.

II. Дослідження мікрофлори силосу

Домінуючі на щільних середовищах колонії асептично відбирають петлею, готують фіксовані в полум'ї пальника і забарвлені фуксином Ціля препарати, які розглядають за допомогою світлового мікроскопу в імерсійній системі.

Оформлення результатів роботи

Протокол має складатися з опису методики виконання лабораторної роботи, наведення результатів, висновків.

Результати:

Звідки і коли отриманий силос: _____

Дата проведення досліджень силосу: _____

Кислотність силосу: _____

Замальовані результати мікроскопування первинного препарату (відбиток силосу на склі) з вказуванням збільшення. За бажанням можна додати фото.

Короткий опис морфології клітин препарату: _____

Якісний та кількісний склад силосної мікрофлори:

Тривалість інкубування на елективних середовищах: _____

Група мікроорганізмів, що визначали _____
на середовищі _____

- Короткий опис морфології колоній і їх кількість. Якщо їх утворилося декілька типів, то окремо наводиться опис кожного типу: _____
- Замальовані результати мікроскопування препарату (препаратів) з вказуванням збільшення. За бажанням можна додати фото.
- Короткий опис морфології клітин.

Висновки:

наводяться висновки щодо параметрів дослідженого силосу та висновок щодо його якості.

Контрольні запитання.

1. Який процес називається силосуванням та що лежить в його основі?
2. З якою метою здійснюють силосування?

3. Наведіть етапи силосування.
4. Наведіть параметри якісного силосу.
5. Які мікроорганізми проймають участь у процесі силосування?
6. Яким чином відбирають середню пробу силосу.
7. Що таке буферність рослинної сировини та як вона визначається?
8. Що таке цукровий мінімум рослинної сировини?
9. Які середовища та з якою метою застосовуються для дослідження силосу?
10. Яким чином визначають кислотність силосу?

ТЕМА 3. БАКТЕРІАЛЬНІ ТА БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ ПРЕПАРАТИ ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА

Лабораторна робота 4

ВИДІЛЕННЯ КУЛЬТУРИ-ПРОДУЦЕНТУ АЗОТНИХ БІОДОБРИВ

(2 заняття)

Мета роботи: оволодіти навичками виділення чистих культур бульбочкових бактерій з природного середовища і дослідження їхніх властивостей.

Короткі теоретичні відомості

Процес фіксації атмосферного азоту бактеріями має велике значення для загального балансу азоту в ґрунті. Саме ним лімітовані всі інші ланки перетворення азоту. Тому азотфіксація належить до пріоритетних наукових проблем, визначаючи, в значній мірі, достатність забезпечення рослин доступними формами азоту.

Асиміляцію молекулярного азоту, що має значення для землеробства, здійснюють лише прокаріоти, які, залежно від їх взаємин з рослиною, поділяють на 3 групи.

1. Симбіотичні азотфіксатори – мікроорганізми, що існують в симбіозі з рослиною.
2. Асоціативні азотфіксатори – формують асоціації з різними видами небобових рослин. Поділяють на ризосферні (кореневі) і філосферні (листяні) бактерії.
3. Вільноживучі ґрунтові азотфіксатори – живуть незалежно від присутності рослини: поза ризосферою, в ґрунті, навіть в ґрунті доріг.

Усі вони діазотрофи, тобто можуть використовувати для живлення і молекулярний і мінеральний азот. Щорік на поверхні суші бактерії фіксують до 200 млн. т азоту і у водних екосистемах – від 30 до 190 млн. т.

Симбіотична азотфіксація – це здатність бактерій зв'язувати молекулярний азот, знаходячись в симбіозі з вищими рослинами. Більш ніж 1300 видів бобових рослин і більше 200 видів небобових деревних і чагарникових порід (вільха, обліпіха та інші) мають бульбочки на корінні. Деякі (наприклад, тропічна рослина сесбанія) утворюють бульбочки на корінні й стеблах.

Бульбочкові бактерії належать до родів *Rhizobium* (переважно), *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* і інших. Потрапивши в тканини кореня, ці бактерії поширюються зазвичай у вигляді інфекційних ниток – колоній клітин бактерій, що розмножилися. У зрілій бульбочковій тканині бактерійні клітини перетворюються в бактероїди – специфічні форми, оточені мембранами рослинного походження. На відміну від бактерійної клітини, що має форму

палички, бактероїди – грушовидні, сферичні або розгалужені утворення, збільшені в 3–4 рази. Зона бульби з клітинами, як бактеріальної, так і бактероїдної форми отримала назву бактероїдної. Бульбочкові бактерії у формі бактероїдів утворюють нітрогеназний ферментний комплекс, який відновлює молекулярний азот до аміаку.

Розрізняють активні та неактивні культури бульбочкових бактерій. Під активністю бактерій розуміють їхню здатність в симбіозі з бобовими рослинами фіксувати атмосферний азот. Бульбочки, утворені активними штамми забарвлені у рожевий колір завдяки наявності у них пігменту леггемоглобину, та неактивними штамми – у зеленуватий колір і не здатні фіксувати азот.

У характеристиці штамів бульбочкових бактерій застосовується критерій вірулентності – здатність утворювати симбіоз з бобовими рослинами шляхом швидкого проникнення в корінь через кореневі волоски та викликати утворення бульбочок. В симбіотичному комплексі рослина забезпечує бактерії необхідними поживними речовинами і створює для них оптимальні умови росту, а бактерії, що знаходяться у бульбочках, забезпечують рослину азотом. Симбіотичні бактерії без участі рослини практично не здатні фіксувати азот. Крім того, бульбочкові бактерії різних видів мають індивідуальну вибіркову здатність до інфікування різних видів бобових рослин.

Форма і розміри бульбочок різних бобових рослин неоднакові. У конюшини вони довгасті і дрібні, в гороху – округлі і великі. В квасолі і сої діаметр бульбочок досягає 1 см, а в люпину інколи – величини волоського горіха. Руйнування бульбочок супроводжується деградацією елементів рослинної клітини і лізисом частини бактероїдів, тоді як остання їх частина утворює дрібні коккоподібні клітини – артрспори, що виконують функцію розмноження і збереження в природі.

При вивченні бульбочкових бактерій в світловому мікроскопі артрспори не помітні, їх можна виявити лише за допомогою електронного мікроскопу при великому збільшенні.

Бульбочкові бактерії – це грамнегативні аеробні рухливі палички розміром $0,5\text{--}0,9 \times 1,2\text{--}3,0$ мкм, що не утворюють спор. Серед них зустрічаються і кокоподібні клітки. У старих культурах клітини більшого розміру, паличкоподібні, нерухомі, зрідка зустрічаються Т-подібні бактероїдні форми. Їх ріст на середовищах з вуглеводами звичайно супроводжується рясним утворенням позаклітинного слизу полісахаридної природи.

За швидкістю росту бульбочкові бактерії поділяють на ті, що ростуть повільно, наприклад *Bradyrhizobium japonicum* в люпині, сої, і ті, що ростуть швидко – в гороху, конюшини і ін.

Методика виконання роботи

І. Виділення чистих культур бульбочкових бактерій

1. Мікроскопування бульбочкових бактерій

Для ознайомлення з морфологічними формами різних видів бульбочкових бактерій з бактероїдної тканини бульбочки готують фіксовані і забарвлені препарати, а також препарат «розчавлена крапля». Якщо бульбочка велика, її розрізають скальпелем на дві частини і поверхню зрізу багаторазово проколюють стерильною голкою, викликаючи якнайбільше механічне руйнування клітин. Проколоту бульбочку переносять в пробірку і суспендують в 1 см³ стерильної води. Потім мікробіологічною петлею краплю суспензії наносять на предметне скло і готують фіксований і забарвлений препарат. Забарвлюють препарат фуксином або сумішшю рівних частин фуксину та метиленового синього у 1% оцтовій кислоті. Забарвлювати препарат необхідно 3–5 с. На препараті тканина бульбочки забарвлюється у синій колір, а самі бактерії – в червоний.

При перегляді під мікроскопом препарату «розчавлена крапля» відзначають велику рухливість живих клітин бульбочкових бактерій. Кожна клітина здійснює вібруючі, тремтячі рухи, займаючи то вертикальне, то горизонтальне по відношенню до ока дослідника положення. Бактерії в основному дрібні та дуже поліморфні.

Бульбочки замальовують та описують (розташування на коренях та морфологію у розрізі). Також замальовують і коротко описують морфологію клітин, що були розглянуті при мікроскопуванні препарату.

2. Виділення чистих культур бульбочкових бактерій

З бульбочок однорічних бобових рослин бактерії виділяють в період бутонізації-цвітіння рослини-господаря, з бульбочок багатолітніх рослин – на другому році життя.

Живильним середовищем для виділення бульбочкових бактерій є середовище Фреда. На цьому середовищі бульбочкові бактерії утворюють безбарвні або молочно-білі, часто слизові, колонії, за виключенням рожево-червоних колоній бульбочкових бактерій з бульбочок *Lotononis bainesii*. Склад середовища Фреда: маніт – 10,0 г; КН₂РО₄ – 0,5 г; МgSO₄ – 0,2 г; NaCl – 0,1 г; СаСО₃ – 3,0 г; дріжджова вода (рН=6,8) – 100 см³; агар – 20 г; дистильована вода (рН=7,0) – 0,9 дм³.

Для бульбочкових бактерій, що ростуть повільно (сої, люпину) слід використовувати середовище Ісварана. Бактерії з люпину і сої утворюють менш прозорі з невеликою кількістю слизу і щільніші, схожі на краплі стеарину, білуваті колонії-штрихи. Склад середовища Ісварана (г/дм³ водопровідної

води): маніт – 10 г; K_2HPO_4 – 0,5 г; $MgSO_4$ – 0,2 г; NaCl – 0,1 г; глюконат кальцію – 1,5 г; $FeCl_3$ – 0,01 г; дріжджовий екстракт – 2 г; агар – 20 г.

Досліджуються бобові рослини, а саме такі, що на коренях містять бульбочки.

Від ретельно промитого у водопровідній воді кореня відокремлюють пінцетом або лезом найбільші бульбочки, переносять їх у фарфорову ступку, куди наливають невелику кількість 96%-ного етилового спирту ($2-3\text{ см}^3$) на декілька хвилин. Після цього бульбочки багато разів промивають стерильною водою.

Стерильним пінцетом бульбочки переносять в стерильну чашку Петрі і стерильним ножом або скальпелем їх розрізають на частини. Бактеріологічною петлею беруть невелику кількість вмісту бульбочки, переносять в краплю стерильної води на поверхню агарового живильного середовища в чашці Петрі і розмазують шпателем. Цим же шпателем роблять посів послідовно ще на 2–3 чашки для отримання окремих колоній (виснажувальний посів).

Засіяні чашки витримують в термостаті при $+25-27^\circ\text{C}$. Швидкоростучі бульбочкові бактерії з'являються на 3–4 добу, повільноростучі – на 7–9 добу. Поява колоній на 1–2 добу свідчить про забруднення культури.

II. Мікроскопування та підрахунок результатів

Домінуючі на щільних середовищах колонії відбирають, готують препарат який забарвлюють за Грамом та мікроскопують. Замальовують та описують мікроморфологію та характерні особливості колоній бульбочкових бактерій. Наводять короткі висновки.

Оформлення результатів роботи

Протокол має складатися з опису методики виконання лабораторної роботи, наведення результатів, висновків.

Результати:

Вид досліджуваної рослини: _____

Звідки і коли відібрано рослину: _____

Опис бульбочок (розташування на коренях та морфологія у розрізі):

Замальовані результати мікроскопування препарату з вказуванням збільшення. За бажанням можна додати фото.

Короткий опис морфології клітин.

Мікроорганізми, що вирости на середовищі Фреда:

- Короткий опис морфології колоній. Якщо їх утворилося декілька типів, то окремо наводиться опис кожного типу.

- Замальовані результати мікроскопування препарату (препаратів) з вказуванням збільшення. За бажанням можна додати фото.
- Короткий опис морфології клітин.

Мікроорганізми, що вирости на середовищі Ісварана:
таким самим чином

Висновки:

наводяться висновки щодо мікрофлори бульбочки.

Контрольні запитання

1. Що таке діазотрофи та на які групи вони поділяються?
2. Що таке симбіотична азотфіксація та які мікроорганізми на неї здатні?
3. Що розуміють під активністю бульбочкових бактерій?
4. Що таке вірулентність бактерій?
5. Дайте коротку характеристику бульбочковим бактеріям.
6. Яким чином проводять мікроскопування бульбочкових бактерій у бульбочці?
7. Яким чином отримують накопичувальну культуру бульбочкових бактерій?

Лабораторна робота 5

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПРЕПАРАТИ АЗОТНИХ БІОДОБРИВ

(2 заняття)

Мета роботи: оволодіння навичками визначення складу та життєздатності азотобактерій – основного компоненту бактерійних добрив.

Короткі теоретичні відомості

Багато ґрунтових мікроорганізмів покращують родючість ґрунтів завдяки здатності до мінералізації органічних та неорганічних речовин, підвищення ефективності використання мінеральних та органічних добрив, збагачення ґрунту молекулярним азотом повітря та синтезу ряду корисних для рослин речовин – полісахаридів, білків, вітамінів, гормонів росту, антибіотиків-фунгіцидів тощо. В результаті їх життєдіяльності підвищується врожайність рослин. Але в зв'язку з не завжди правильною сільськогосподарською діяльністю, в тому числі з використанням хімічних добрив та великим антропогенним навантаженням на ґрунти, що призводить до їх деградації та

різкого зменшення продуктивності рослин, актуальним є відновлення ґрунтів біологічними методами, тобто використовуючи препарати біотехнологічного походження – бактерійні добрива.

В практиці сільського господарства знайшли застосування різні типи бактеріальних добрив, що можуть містити або монокультуру або комплекс мікроорганізмів, які збагачують ґрунти та кореневу систему рослин: нітрагін, ризоторфін, азотобактерин, фосфобактерин та інші.

Нітрагін являє собою бактерійне добриво, основою якого є життєздатні клітини бульбочкових бактерій роду *Rhizobium*. Ці бактерії використовуються для підвищення врожайності різних бобових рослин – кvasолі, гороху, сої, конюшини, люцерни, люпину та ін.

Різними формами нітрагину є ґрунтовий, сухий та торф'яний (ризоторфін). Ґрунтовий нітрагін являє собою культуру бульбочкових бактерій, яка вирощена у стерильному садовому ґрунті. Сухий нітрагін – це порошок висушених клітин бактерій роду *Rhizobium* у суміші з наповнювачем (каолін, бентоніт, крейда), але оскільки клітини бульбочкових бактерій дуже чутливі до втрати води, тому більша частина клітин гине під час висушування. Цього вдається уникнути при виробництві торф'яної форми нітрагину – ризоторфіні. При отриманні ризоторфіну бульбочкові бактерії вирощують у стерильних запаяних пакетах з подрібненим та зволженим торфом.

Бактерії роду *Azotobacter* використовуються для виготовлення на його основі бактеріального добрива азотобактерину. *Azotobacter* – аеробні вільноживучі грамнегативні бактерії, які фіксують азот повітря та використовують його для своєї життєдіяльності. Азотобактер фіксує азот лише в середовищі, бідному або взагалі звільненому від зв'язаного азоту. При його розкладанні в ґрунті утворюються доступні для рослин поживні речовини з великим вмістом азоту. Азотобактерин використовується для передпосівної обробки насіння, розсади, прикореневого підживлення сільськогосподарських (томати, салати, огірки) та кімнатних рослин і покращення показників родючості ґрунту. Однак відомо, що дія азотобактерій на рослини також обумовлена його здатністю синтезувати біологічно активні речовини – нікотинову та пантотенову кислоти, піридоксин, біотин, гетероауксини, гібереліни, фунгіцидні речовини та ін. Цей комплекс речовин стимулює проростання насіння рослин, прискорює їх ріст, захищає від патогенних грибів. В той же час азот, що фіксується азотобактеріями, суттєво не впливає на урожайність рослин.

Виробляють азотобактерин сухий та торф'яний.

Фосфобактерин – це препарат у вигляді порошку, який містить життєздатні спори культури *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, здатної

перетворювати складні фосфорорганічні сполуки та мінеральні фосфати в доступну для рослин форму. Фосфобактерин застосовують для підвищення урожайності картоплі, цукрового буряку, зернових на чорноземних ґрунтах, що відрізняють невеликим вмістом фосфорорганічних речовин.

Методика виконання роботи

I. Десорбція азотобактерій та висів на живильні середовища

Препарат біодобрива масою 10 г розтирають в ступці у невеликій кількості стерильного 0,2%-ного розчину пірофосфату до пастоподібного стану, переносять у колбу на 250 см³ і додають 90 см³ стерильного 0,2%-го розчину пірофосфату натрію. Колбу з суспензією ретельно перемішують протягом 30 хв. З отриманої суспензії готують розведення 10⁻³–10⁻⁹.

Розведення виконують асептично. Для приготування кожного розведення використовують окрему стерильну піпетку або кожного разу новий стерильний наконечник для самплера. При внесенні суспензії у наступну пробірку піпетка не повинна торкатися води. Готують десяти- та стократні розведення наступним чином: у пробірку з 4,95 см³ стерильної водопровідної води вносять 0,05 см³ досліджуваної суспензії та ретельно перемішують – отримують розведення у 100 разів (10⁻²); відбирають звідти 0,05 см³ і переносять у наступну пробірку з 4,95 см³ стерильної водопровідної води – отримують розведення вихідного зразка у 10000 разів (10⁻⁴). Далі виконуємо послідовні розведення 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ та 10⁻⁹. Для виконання вже цих розведень, потрібно провести розведення в 10 разів (наприклад, з 10⁻⁶ отримати 10⁻⁷). Для цього необхідно перенести 0,5 см³ суспензії у пробірку з 4,5 см³ стерильної водопровідної води.

З останніх трьох розведень по 1 см³ суспензії наливають в стерильні чашки Петрі і заливають шаром розплавленого та охолодженого до +45°C агаризованого середовища Ешбі наступного складу (г/дм³ дистильованої води): сахароза або маніт – 20,0; КН₂РO₄ – 0,2; MgSO₄·7H₂O – 0,2; NaCl – 0,2; K₂SO₄ – 0,1; СаСО₃ – 5,0. В середовище рекомендовано додавати розчин мікроелементів за Федоровим (обов'язкова наявність молібдену) – 1 см³/дм³. Середовище з суспензією бактерій в чашках перемішують, дають застигнути та витримують в термостаті при +28°C протягом 3–4 діб.

Для визначення кількості сторонньої мікрофлори в біодобриві суспензію мікроскопують та висівають по 0,1 см³ з розведень 10⁻³, 10⁻⁷, 10⁻⁹ на чашки Петрі з МПА. Інкують в термостаті при +28°C протягом 1–2 діб.

II. Мікроскопування та підрахунок результатів

З домінуючих на щільних середовищах колоній готують фіксовані в полум'ї пальника і забарвлені фуксином Циля препарати, які розглядають за допомогою світлового мікроскопу в імерсійній системі.

Оформлення результатів роботи

Протокол має складатися з опису методики виконання лабораторної роботи, наведення результатів, висновків.

Результати:

Препарат, що досліджувався:

- назва _____
- склад _____
- виробник _____
- дата виробництва _____
- якому НТД відповідає _____

Група мікроорганізмів, що визначали _____

Короткий опис морфології колоній. Якщо їх утворилося декілька типів, то окремо наводиться опис кожного типу.

Замальовані результати мікроскопування препарату (препаратів) з вказуванням збільшення. За бажанням можна додати фото.

Короткий опис морфології клітин.

Концентрація азотобактерій в препараті, що була визначена: _____

Наявність сторонньої мікрофлори: є/немає, в якій кількості, короткий опис колоній та морфології клітин

Висновки:

наводяться висновки щодо якості дослідженого біодобрива і загальної його якості.

Контрольні запитання

1. Які види бактерійних добрив Вам відомі?
2. Які мікроорганізми входять до складу бактерійних добрив?
3. Яку біологічну роль у ґрунті виконують бактерії роду *Azotobacter*?
4. Яким методом визначають життєздатність *Azotobacter* у азотобактерині?

Лабораторна робота 6
ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОДУЦЕНТА
КОРМОВОГО РИБОФЛАВІНУ
(2 заняття)

Мета роботи: отримання навичок дослідження фізіолого-біохімічних властивостей та методів культивування аскоміцету *Eremothecium ashbyi* – продуценту кормового вітаміну B₂.

Короткі теоретичні відомості

Рибофлавін є одним з найбільш розповсюджених вітамінів, необхідних для життєдіяльності тварин та людини. Він виявляється у всіх тваринних і рослинних клітинах та лише деякі продукти містять даний вітамін в значущих кількостях. Найбільша концентрація рибофлавіну наявна у дріжджах та печінці, але найбільш розповсюдженими харчовими джерелами рибофлавіну є молоко та молочні продукти, м'ясо, яйця, овочі та зелень.

Біологічне значення цього вітаміну полягає в тому, що він є попередником коферментів флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавинаденіндинуклеотиду (ФАД). Коферменти входять до складу таких важливих окислювально-відновних ферментів, як сукцинатдегідрогеназа, цитохромредуктаза, глутатіонредуктаза, ксантиноксидаза, оксидази амінокислот та ряд інших. Ці ферменти приймають участь в окисленні жирних кислот, в окислювальному декарбоксилюванні піровиноградної та α -кетоглутарової кислот, окисленні бурштинової кислоти в циклі трикарбонових кислот.

Рибофлавін синтезує більша частина вищих рослин та багато мікроорганізмів, включаючи бактерії, дріжджі та гриби. Організм тварин не здатен до самостійного синтезу рибофлавіну і їх потреба в ньому задовольняється мікрофлорою шлунково-кишкового тракту та з їжею. Рибофлавін не накопичується в організмі, тому необхідне його постійне надходження з їжею. Рибофлавін з тваринних продуктів засвоюється краще, ніж з рослинних джерел, що пов'язано з його знаходженням у вільному або зв'язаному стані. Так, у коров'ячому, овечому та козиному молоці не менш 90% рибофлавіну знаходиться у вільній формі, в більшості інших продуктах він зв'язаний з білками.

Велике значення має рибофлавін для тваринництва і особливо птахівництва. Велика рогата худоба і коні не потребують додаткового отримання вітаміну ззовні, оскільки він синтезується мікрофлорою рубця та кишечника. Однак гіповітаміноз у свиней та птахів (кури, гуси, індички) може призвести до летального результату. Використання препарату кормового B₂ у

тваринництві збільшує приріст за масою тварин та птахів до 15%, на 30% знижує смертність, на 3% збільшує яйценосність у курей та на 6% виводимість курчат.

Промислове одержання рибофлавіну здійснюється хімічним, мікробіологічним та комбінованим синтезом. Хімічний синтез рибофлавіну менш поширений, ніж мікробний синтез, оскільки є багатостадійним і потребує значних матеріальних витрат. У зв'язку з цим багато великих виробників (Sigma Aldrich, BASF, Roche, ADM/Aventis, Huabei Guangji) використовують біотехнологічний спосіб отримання вітаміну B₂.

Мікроорганізми-продуценти рибофлавіну поділяють на 3 групи:

- слабкі (*Clostridium acetobutylicum*);
- помірні (дріжджі *Pichia guilliermondii*, *Candida flareri*);
- сильні суперпродуценти (*Eremothecium ashbyi*, *Eremothecium (Ashbya) gossipii*).

Близько третини світового виробництва рибофлавіну базується на штаммах виду *Eremothecium*. Для отримання кормових препаратів вітаміну B₂ використовують штами *E. ashbyi*, які належать до класу сумчастих грибів, або аскоміцетів (рис. 6.1). *E. ashbyi* паразитує на коробочках бавовнику, утворює справжній розгалужений багатоядерний міцелій, що зрідка септований, плодових тіл не утворює.



Рис. 6.1. *Eremothecium ashbyi* на глюкозо-пептонно-дріжджовому середовищі, 6 доба культивування

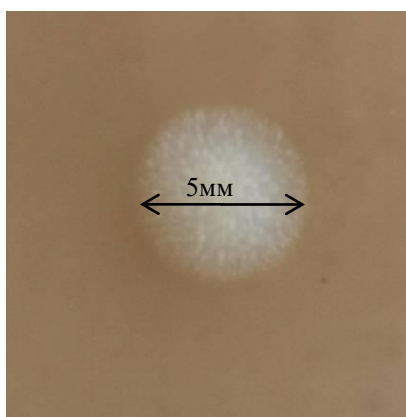
Міцелій має яскраво-жовтий колір, обумовлений присутністю рибофлавіну, який накопичується в такій кількості, що утворює кристали у

вакуолях (рис. 6.2). Аски утворюються з видовжених вегетативних клітин або клітин міцелію без попередньої кон'югації. Після дозрівання вони руйнуються з вивільненням спор. Аскоспори по 8–32 в аску, веретеноподібні, голкоподібні.

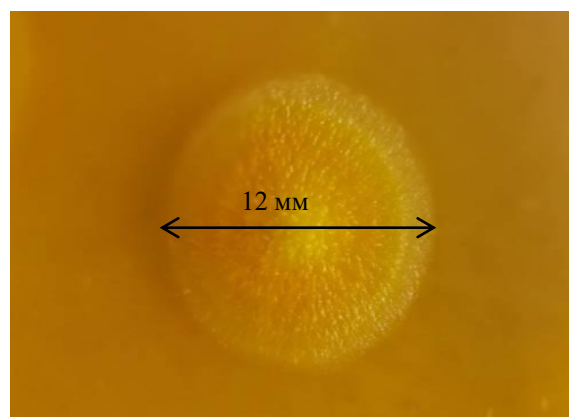


Рис. 6.2 Міцелій *Eremothecium ashbyi*, x900

Колонії *E. ashbyi* на агаризованих середовищах мають два основних варіанти забарвлення: білі та яскраво-жовті (рис. 6.3). Яскраво-жовте забарвлення наявне за рахунок накопичення у клітинах рибофлавіну. За великого накопичення рибофлавіну колонії можуть мати помаранчевий і, навіть, коричневий колір. Оскільки більша частина рибофлавіну виходить з клітин у середовище культивування, воно також забарвлюється у жовтий колір. Білі колонії характеризуються меншим розміром та незначним накопиченням рибофлавіну.



а



б

Рис. 6.3. *Eremothecium ashbyi* на агаризованих середовищах:
а – білі колонії, б – жовті колонії

Культура *E. ashbyi* має приємний запах ефірної олії троянди за рахунок накопичення грибом у середовищі ароматичних речовин (гераніол, нерол та лінаноол).

Біосинтез рибофлавіну *E. ashbyi* проводять в глибинних умовах у ферментері за температури +28–30°C, постійному перемішуванні зі швидкістю 250 об/хв та аерації зі швидкістю 220 см³/хв протягом 80–84 годин.

Для отримання кормового препарату рибофлавіну культуральну рідину випарюють в вакуумі до 30–40% сухих речовин та сушать у розпилювальній або валково-вакуумній сушарці. Готовий продукт являє собою порошок жовто-бурого кольору, який містить не менш 10 мг/г рибофлавіну та до 20% протеїну.

Дослідження рівня накопичення рибофлавіну в культуральних фільтратах проводиться спектрофотометричним методом. Точність визначення залежить від наявності у культуральній рідині інших гетероциклічних сполук. Досліджувані проби повинні бути абсолютно прозорі, тому обов'язковим є повне осадження білків трихлороцтовою кислотою (ТХО) так само, як і попереднє видалення жовтих пігментів. З цією метою дослідні розчини обробляють перманганатом калію, надлишок якого нейтралізують перекисом водню.

Методика виконання роботи

I. Отримання посівного матеріалу культури *E. ashbyi*

Отримання посівного матеріалу здійснюють у два етапи:

1. *E. ashbyi* вирощують у великих пробірках на глюкозо-пептонно-дріжджовому живильному середовищі складу (г/дм³): глюкоза – 10, пептон ферментаційний – 3, екстракт кормових дріжджів – 5, агар – 20, рН 6,0. Культивування на агаризованому середовищі здійснюють протягом 7 діб у термостаті за температури 28°C.

2. Для отримання глибинного посівного матеріалу культуру з пробірок з агаризованим середовищем за допомогою мікробіологічної петлі пересівають в конічні колби об'ємом 250 см³ (заповнення 20%) з рідким глюкозо-пептонно-дріжджовим середовищем (склад наведено вище, без агару). Культивують протягом 4 діб на орбітальному шейкері лабораторному при 150-200 об/хв у термостатованій кімнаті за температури 28±2°C.

Морфологію посівної культури *E. ashbyi* досліджують шляхом приготування препарату з наступним його мікроскопуванням. Для приготування препарату спочатку на знежирене предметне скельце наносять 1-2 краплі препарувальної суміші (вода : етанол : гліцерин = 1:1:1), потім мікробіологічною петлею відбирають невелику частину колонії з агаризованого

середовища, переносять її на предметне скло, розпрямляють голками і накривають покривним скельцем. Препарат мікроскопують при різних збільшеннях світлового мікроскопу, замальовують та описують морфологію колоній на агаризованому середовищі та мікоморфологію культури. Аналогічно мікроскопують глибинний посівний матеріал, замість колонії петлею відбирають глибинний міцелій. Описують характер глибинного росту та особливості мікоморфології.

II. Глибинне вирощування культури *E. ashbyi*

Визначення оптимальної для накопичення біомаси та рибофлавіну концентрації глюкози здійснюють за допомогою однофакторного експерименту. Однофакторний експеримент – це експеримент, при проведенні якого досліджується вплив одного фактора (концентрації глюкози) на досліджуваний параметр, у нашому випадку це біомаса та кількість рибофлавіну. Інші фактори, що також можуть впливати на досліджуваний параметр, фіксуються на одному рівні.

Приготування ферментаційного середовища:

1. готують 200 см³ середовища, що містить 5 г/дм³ дріжджового екстракту та 3 г/дм³ пептону, стерилізують автоклавуванням при 0,5 атм 30 хв;
2. готують 50 мл 50% розчину глюкози, який стерилізують автоклавуванням при 0,5 атм 30 хв;
3. асептично розливають по 50 см³ середовища у конічні колби об'ємом 250 см³;
4. у кожену колбу асептично додають таку кількість глюкози, щоб її концентрація у середовищі становила 10, 20, 30 та 40 г/дм³.

Засів колб з ферментаційним середовищем проводиться наступним чином: у стерильних умовах з колби з посівним матеріалом у рідке ферментаційне середовище стерильною піпеткою з відбитим носиком переносять 0,5 см³ інокуляту. Об'єм інокуляту – 1% від об'єму середовища, що засівається.

Культивування проводиться на орбітальному шейкері в колбах (250 см³) з 50 см³ середовища при +28–30°C, перемішуванні при 200 об/хв протягом 7 діб.

II. Дослідження накопичення рибофлавіну культурою *E. ashbyi* в глибинних умовах

По закінченню глибинного культивування мікробіологічною петлею відбирають біомасу, готують препарат і проводять мікроскопування глибинної культури *E. ashbyi* так само, як посівної культури.

1. Параметри росту продуценту в глибинній культурі

В колбах візуально відзначають кількість вирослої біомаси (рис. 6.4) (багато, середня кількість, мало), форму росту міцелію (кульки, пелети, обідок на поверхні колби), колір біомаси та живильного середовища, запах культуральної рідини.



Рис. 6.4. Культура *E. ashbyi* на рідкому живильному середовищі

Біомасу *E. ashbyi* відфільтровують на попередньо висушених та зважених фільтрах, висушують за +105°C до постійної ваги для визначення концентрації біомаси. Далі в фільтраті культуральної рідини проводять визначення якісних та кількісних показників росту та біосинтезу рибофлавіну культурою *E. ashbyi*.

2. Якісні реакції на наявність рибофлавіну

Водні розчини рибофлавіну мають інтенсивну жовто-зелену флуоресценцію в УФ-світлі (рис. 6.5). Для проведення визначення пробірку з 1 см³ культурального фільтрату розглядають в ультрафіолетовому світлі.

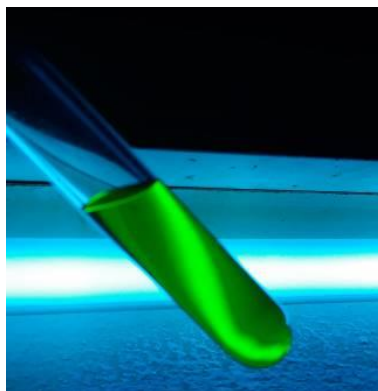


Рис. 6.5. Флуорисценція рибофлавіну

Ще однією якісною реакцією на наявність вітаміну В₂ є його здатність утворювати специфічні кристали. Для проведення такого визначення крапля культурального фільтрату наноситься на предметне скельце та накривається покривним скельцем. При висушуванні утворюються кристали рибофлавіну, які можна розглянути під мікроскопом (x100, x400).

3. Кількісне визначення рибофлавіну

Культуральний фільтрат у кількості 1 см³ вносять у мірну пробірку на 5 см³, додають рівний об'єм (1 см³) 20% ТХО та інкубують у темноті при +38°C протягом 30 хвилин.

За наявності пігментів, що заважають визначенню рибофлавіну, до трихлороцтового екстракту додають по краплям насичений розчин перманганату калію (1-2 краплі) до фіолетового забарвлення, що не зникає. Надлишок перманганату видаляють додаванням по краплям 3% перекису водню до повного зникнення фіолетового забарвлення, після цього пробу доводять 0,1 М фосфатним буфером до мітки 5 см³.

Спектрофотометрують при 450 нм в кюветі 1 см.

Вміст загальних флавінів (в мкг/ см³) розраховують за формулою

$$C = E \cdot b / 0,0325 \cdot a,$$

де E – екстинкція дослідного розчину при 450 нм; a – вихідний об'єм дослідного розчину, см³ (1 см³); b – кінцевий об'єм дослідного розчину, см³ (5 см³).

Оформлення результатів роботи

Протокол має складатися з опису методики виконання лабораторної роботи, наведення результатів, висновків.

Результати:

Вид та штам біологічного об'єкту, що вивчали: _____

Короткий опис морфології колоній на агаризованому середовищі. Якщо їх утворилося декілька типів, то окремо наводиться опис кожного типу.

Замальовані результати мікроскопування препарату культури з агаризованого середовища (препаратів) з вказуванням збільшення. За бажанням можна додати фото.

Короткий опис морфології клітин.

Короткий опис морфології гриба в глибинній культурі: _____

Замальовані результати мікроскопування препарату глибинної культури з вказуванням збільшення. За бажанням можна додати фото.

Короткий опис морфології клітин.

Якісні реакції на наявність рибофлавіну:

Визначена кількість біомаси та рибофлавіну за різних значень глюкози:

Таблиця 6.1 Накопичення біомаси та рибофлавіну *E. ashbyi* за різної концентрації глюкози у середовищі

Концентрація глюкози, г/дм ³	10	20	30	40
Концентрація біомаси, г/дм ³				
Концентрація рибофлавіну, мг/дм ³				

Графіки та рівняння, що описують залежність накопичення біомаси та рибофлавіну у середовищі від вмісту глюкози.

Оптимальна концентрація глюкози для максимального накопичення біомаси, рибофлавіну.

Висновки:

наводяться висновки щодо дослідженої культури *E. ashbyi*, її продуктивності, оптимізації живильного середовища.

Контрольні запитання.

1. Які продукти є джерелами вітаміну B₂?
2. Які мікроорганізми здатні продукувати рибофлавін?
3. Морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні властивості *E. ashbyi*.
4. Наведіть параметри культивування *E. ashbyi*.
5. Опишіть основні технологічні операції при виробництві кормового вітаміну B₂.
6. Як проводять визначення рибофлавіну в культуральній рідині?

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гудзь С.П., Гнатуш С. О., Звір Г. І. Санітарна мікробіологія : підручник для студ. вищ. навч. закл.. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2016. 348 с.
2. Основи ведення сільського господарства та охорона земель: Навч. посібник / Грабак Н.Х., Топіха І.Н., Давиденко В.М., Шевель І.В. Київ : ВД «Професіонал», 2006. 496 с.
3. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія : підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.

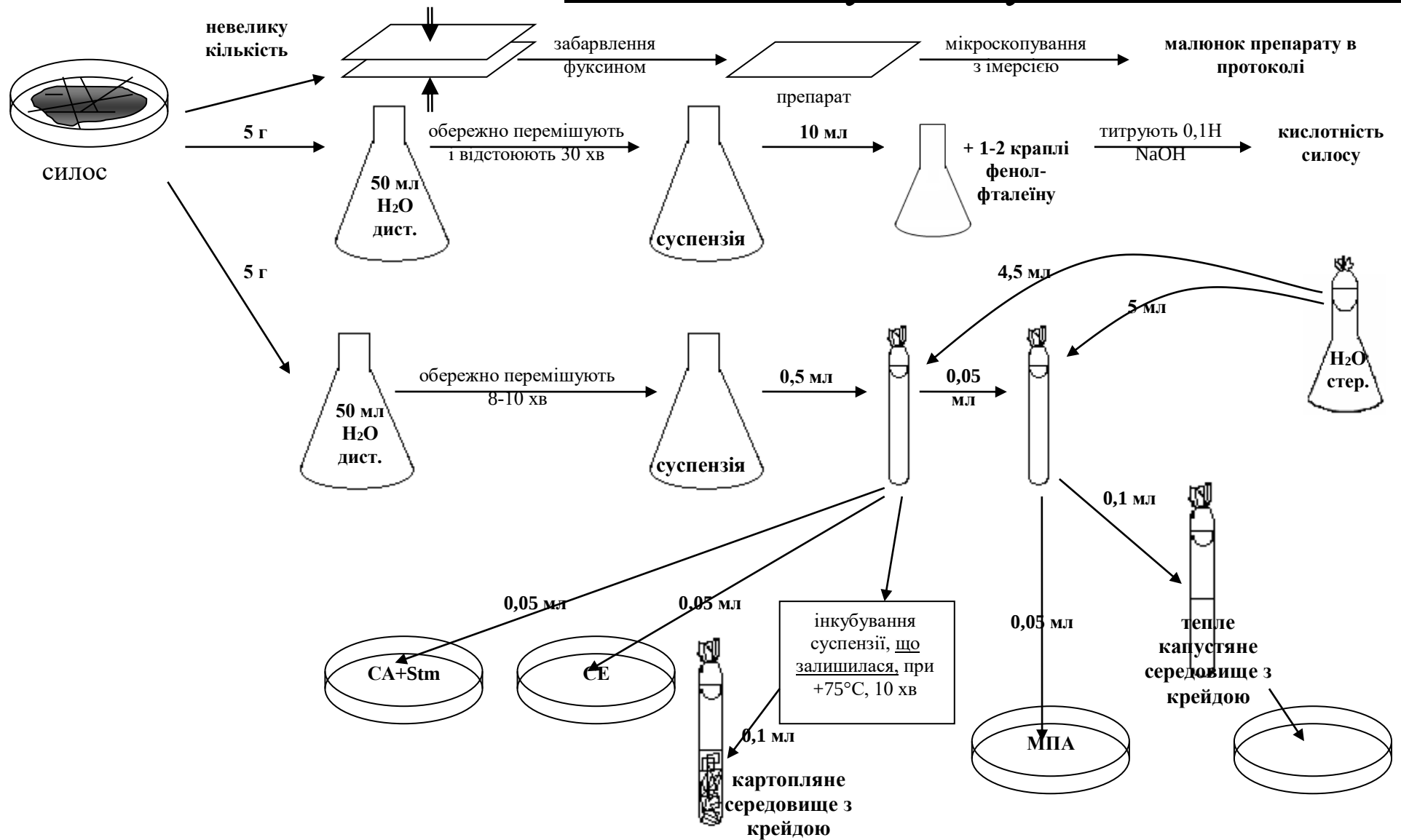
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антоненко Л.О. Біотехнологія отримання біомаси вищих базидіальних грибів роду *Coriolus* : дис. ...канд. техн. наук : 03.00.20. Київ, 2013. 208 с.
2. Волкогон В. В., Козар С. Ф. Мікробіологія сільськогосподарська // Енциклопедія Сучасної України: електронна версія [онлайн]/ гол. редкол.: І. М. Дзюба, А. І. Жуковський, М. Г. Железняк та ін.; НАН України, НТШ. Київ: Інститут енциклопедичних досліджень НАН України, 2019. URL: https://esu.com.ua/search_articles.php?id=67573 (дата перегляду: 08.06.2022)
3. Дзигун Л.П. Біологія базидієвих макроміцетів *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill та *Cerioporus squamosus* (Huds.) Quel. в культурі : дис. ... канд. біол. наук : 03.00.21. Київ, 2020. 203 с.
4. Іванова Т.С. Біотехнологія культивування лікарських макроміцетів на відходах перероблення зернових культур : дис. ... канд. біол. наук : 03.00.20. Київ, 2018. 199 с.
5. Ліновицька В. М. Біологія лікарських базидієвих макроміцетів *Schizophyllum commune* Fr. та *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray в умовах культури : дис. ... канд. біол. наук : 03.00.21. Київ, 2020. 279 с.
6. Поліщук В. Ю. Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill. : дис. ...канд. техн. наук : 03.00.20. Київ, 2018. 177 с.
7. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений./ А.И.Нетрусов, М.А.Егорова, Л.М.Захарук и др.; Под ред. А.И.Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608с.
8. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов. Изд. 5-е, перераб. и доп. – М.: Дрофа. 2004. 256 с.

9. Про відходи : Закон України від 05.03.1998, № 187/98-ВР. *Відомості Верховної Ради України*. 1998. № 36-37. Ст. 242.

Схема аналізу силосу

Додаток А



CA+Stm – агаризоване пивне сусло зі стрептоміцином
 CE – середовище Ендо