

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ  
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.Б.27 Введение в биотехнологию

**Направление подготовки 06.03.01 Биология**

**Профиль образовательной программы Микробиология**

**Форма обучения очная**

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1.</b>	<b>Конспект лекций</b>	<b>4</b>
<b>1.1.</b>	<b>Лекция № 1 Введение в биотехнологию</b>	<b>4</b>
<b>1.2.</b>	<b>Лекция № 2 Основные объекты биотехнологии и их народнохозяйственное значение</b>	<b>8</b>
<b>1.3.</b>	<b>Лекция № 3 Биотехнология высших растений</b>	<b>12</b>
<b>1.4.</b>	<b>Лекция № 4 Генетическая инженерия животных</b>	<b>17</b>
<b>1.5.</b>	<b>Лекция № 5 Основные методы, используемые в промышленной биотехнологии.</b>	<b>19</b>
<b>1.6.</b>	<b>Лекция № 6 Технологическое оборудование промышленного назначения</b>	<b>25</b>
<b>1.7.</b>	<b>Лекция № 7 Продукты биотехнологии и блок схемы их производства</b>	<b>27</b>
<b>1.8.</b>	<b>Лекция № 8 Представление о нанобиотехнологиях</b>	<b>31</b>
<b>1.9.</b>	<b>Лекция № 9 Международная и Российская законодательная база по биобезопасности</b>	<b>34</b>
<b>1.10.</b>	<b>Лекция № 10 Стандартизация, принципы контроля и сертификации биопрепаратов</b>	<b>41</b>
<b>2.</b>	<b>Методические указания по выполнению лабораторных работ</b>	<b>49</b>
<b>2.1.</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-1 Получение и накопление культур сенной и картофельной палочек</b>	<b>49</b>
<b>2.2.</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-2 Антагонизм микроорганизмов</b>	<b>49</b>
<b>2.3.</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-3 Антагонизм микроорганизмов</b>	<b>50</b>
<b>2.4.</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-4 Определение чувствительности микроорганизмов к различным фитонцидам</b>	<b>50</b>
<b>2.5.</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-5 Образование лимонной кислоты грибом <i>Aspergillus niger</i></b>	<b>51</b>
<b>2.6.</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-6 Получения каллусов из незрелых зародышей пшеницы</b>	<b>52</b>
<b>2.7.</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-7 Получение каллусов из корешков фасоли</b>	<b>52</b>
<b>2.8.</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-8 Субкультивирование каллусов</b>	<b>53</b>
<b>2.9.</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-9 Получение и культивирование супензии картофеля</b>	<b>54</b>

<b>2.10. Лабораторная работа № ЛР-10</b>	Кислотный гидролиз крахмала	<b>55</b>
<b>2.11. Лабораторная работа № ЛР-11</b>	Приготовление питательных сред для культивирования культур клеток	<b>56</b>
<b>2.12. Лабораторная работа № ЛР-12</b>	Определение общей и биологической концентрации микроорганизмов	<b>57</b>
<b>2.13. Лабораторная работа № ЛР-13</b>	Определение антимикробной активности антибиотиков	<b>59</b>
<b>2.14. Лабораторная работа № ЛР-14</b>	Обнаружение амилазы в прорастающих семенах	<b>61</b>
<b>2.15. Лабораторная работа № ЛР-15</b>	Получение микроклубней картофеля <i>in vitro</i>	<b>62</b>
<b>2.16. Лабораторная работа № ЛР-16</b>	Изучение методики выделения изолированных протопластов	<b>63</b>
<b>2.17. Лабораторная работа № ЛР-17</b>	Изучение методики выделения изолированных протопластов	<b>64</b>
<b>2.18. Лабораторная работа № ЛР-18-19</b>	Контроль качества антибактериальных вакцин	<b>64</b>

# **1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ**

## **1. 1 Лекция № 1. (2 часа).**

**Тема: «Введение в биотехнологию»**

### **1.1.1 Вопросы лекции:**

1. Определение биотехнологии как науки в области практической деятельности человека.
2. Задачи и перспективы биотехнологии в XXI веке. Биотехнология как одно из древнейших направлений деятельности человека.
3. Новейшие методы получения, трансформации и улучшения пищевых продуктов в настоящее время и на перспективу.
4. Сельскохозяйственная биотехнология как основа прогресса в растениеводстве и животноводстве.

### **1.1.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Предмет изучения биотехнологии. Основные этапы развития биотехнологии**

Термин «Биотехнология» впервые был предложен в 1917 году венгерским инженером Карлом Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки биотехнология - это все виды работ при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты. Однако этот термин (вообще-то обозначающий суть данной науки не получило широкого распространения). Долгое время термин биотехнология относился к двум разным наукам: 1) промышленной ферментации; 2) эргономике.

И лишь в 1961 году шведский микробиолог Карл Гёрен Хеден предложил переименовать журнал «Журнал микробиологической и химической инженерии и технологии» в «Биотехнология и биоинженерия». И сейчас в современном понимании биотехнология – это наука о технологиях создания и использования биологических объектов, способствующих интенсификации производства или получению новых видов продуктов различного назначения на основе методов клеточной и генетической инженерии.

Вам хорошо известен метод микробиологической ферментации - для сохранения и улучшения вкуса пищи, производства спиртных напитков. (Пивоварение до настоящего времени остается одной из доходных отраслей биотехнологии - она приносит ежегодно до 175 млн. долларов). Благодаря трудам Л.Пастера в конце 19 века были созданы условия для развития прикладной (технической) микробиологии. Пастер установил, что микроорганизмы участвуют в процессах брожения и показал, что в образовании отдельных продуктов участвуют разные их виды.

Это послужило основой развития в 19-20 веках бродильного производства органических растворителей (ацетона, этанола, бутанола, изопропанола) и других химических веществ, где используются разные виды микроорганизмов. На первом этапе биотехнологии ведущую роль играли процессы, в которых биомасса (т.е. возобновляемый источник сырья) использовали для получения химических веществ. Следующим важным этапом в развитии биотехнологии была организация промышленного производства антибиотиков. (Открытие А.Флемингом, Х. Флори и Э. Чейном - химиотерапевтической активности пенициллина). Сегодня годовой оборот этой отрасли составляет около 3,5 млрд. долларов. Если получение химических соединений и пищевых добавок требует асептических условий и осуществляется в жестком режиме, то такая отрасль биотехнологии - как переработка отходов не требует стерильных условий, напротив чем больше разных микроорганизмов принимает участие в процессе тем лучше. (А настоящее время переработку отходов осуществляют смешанной микрофлорой в результате чего образуется биогаз – он состоит из метана и CO<sub>2</sub>. Этот способ энергетически высокоэффективен, позволяет сохранять и концентрировать энергию, содержащуюся в

разных компонентах стоков. С газом регенерируется 80% свободной энергии, а в сельской местности с его помощью можно получать значительную часть необходимой энергии. В Китае построено более 18 млн. генераторов биогаза. Широкое распространение получило производство аминокислот в аэробный микробиологических процессах. В основном это глутамат натрия и лизин. Ежегодно в мире глутамата натрия производят около 150 тыс. тонн. Глутамат натрия - это усилитель вкуса. Лизин - это пищевая добавка – его производят около 15 тыс.тонн. За год в мире продается аминокислот на сумму 1, 75 млрд. долларов (основной производитель – японские фирмы). В течение многих десятилетий, используется способность микроорганизмов превращать растительную массу с низким содержанием белка - в пищевые продукты, с высоким содержание белка. (В Германии в первую мировую войну выращивали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые добавляли в колбасу и супы. Во время второй мировой войны подобные процессы, но уже на основе пищевых дрожжей *Candida arborea* и *Candida utilis*.

В 1960 – х годах нефтяные и химические компании начали проводить исследования с целью получения из одноклеточных микроорганизмов белка, предназначенного в пищу людям и животным. В качестве субстрата использовали нефть, метан, метanol и крахмал. Наиболее эффективными оказались процессы на основе метанола и крахмала – основная масса полученных продуктов предназначалась в корм животным.

В западных компаниях за год на одном ферментере получали около 70 тыс. тонн белка притина при участии метанопотребляющих бактерий *Methylophilus methylotrophus*. (Использование рекомбинантных ДНК привело к увеличению выхода продукта).

В России ежегодно производится более 1 млн. тонн белка одноклеточных водорослей, в основном из углеводородов и отходов растениеводства.

В настоящее время возрастает интерес к использованию ферментов в медицинской промышленности.

Использование клеток микроорганизмов упростило производство лекарственных препаратов стериодной природы.

Использование культур клеток повысило получение вакцин.

Разработка метода слияния клеток позволило получить новые клоны масляничных пальм дающих более высокий урожай и более высокое качество продукции.

В то же время биотехнологические производства представляют собой сложный комплекс биофизических, биохимических и физико-химических процессов, в котором тесно связаны производство и биология. Может быть правильнее называть биотехнологией применение в промышленности биологических систем или процессов.

## **2 Технология и биотехнология.**

Технология – это способы и приемы, используемые для получения из исходного материала некоторого продукта. Часто для получения одного продукта требуется не один, а несколько источников сырья, не один способ, а несколько последовательных процессов. Все технологии можно разделить на 3 основных класса:

- физико-механические - исходный материал меняет форму или агрегатное состояние без изменения химического состава (н-р, технология переработки древесины для производства деревянной мебели)

-химические в процессе производства сырье претерпевает химические изменения (н-р, получение полиэтилена из природного газа)

-биотехнологии

Биотехнология – это целенаправленное получение ценных для народного хозяйства и человека продуктов за счёт биохимической деятельности микроорганизмов, изолированных клеток или их компонентов.

Следовательно биотехнология предполагает использование таких культур бактерий, клеток животных и растений, метаболизм и биологические свойства которых обеспечивают выработку специфических веществ. (Например, в фармацевтической

промышленности это производство вакцин, антибиотиков, аминокислот, гормонов, ферментов, и других БАВ).

Цель биотехнологических исследований – повышение эффективности производства и поиск биологических систем, с помощью которых можно получить целевой продукт.

Биотехнология позволяет воспроизводить нужные продукты в неограниченном количестве, применяя новые технологии.

В промышленном масштабе биотехнология представляет собой биоиндустрию, позволяющую развиваться: микробиологии; биохимии, генетике; химической инженерии; молекулярной биологии; клеточной биологии;

Создавать лекарственные препараты; вакцины;

Разрабатывать новые - диагностические методы;

Создавать высокопродуктивных животных и высокопродуктивные растения.

Расширение сфер применения биотехнологии существенно влияет на повышение уровня жизни человека.

Перечислим достижения биотехнологии в разных отраслях народного хозяйства.

Генная инженерия – позволила создать инсулин, гормон роста человека, соматотропин, создание растений устойчивых к пестицидам, гербицидам; создание трансгенных животных, растений, разработка технологии переработки нефти; создание вакцин.

Биотехнологические процессы в создании пищевых продуктов: использование белка одноклеточных, создание молочных продуктов, пекарное производство, производство пива.

Бимотехнологические процессы в переработке отходов: - бумажные отходы, нефтяные разливы, нефтяные отходы, обработка сточных вод, отходы горных разработок, домашний мусор, токсичные отходы, сельскохозяйственные отходы

Для создания топлива: биогаз (метан), газохол (смесь этанола и бензина).

Биотехнологические методы используются для разработки недр: получения металлов методом биовыщелачивания.

Ферментные биотехнологии - используются для создания биологических стиральных порошков; пектиназы во фруктовых соках;

Использование в медицине - создание антибиотиков, гормонов, моноклональных антител, вакцин.

Создание химических веществ: этилового спирта, ацетона, бутилового спирта.

В сельском хозяйстве - создание растений устойчивых к пестицидам и гербицидам, трансгенных растений и животных, силосование кормов, азотфиксация, клонирование растений из культуры ткани.

### **3 Основные направления развития биотехнологии.**

Раньше для обозначения тесной связи технологий с биологией использовали такие названия как прикладная микробиология, прикладная биохимия, прикладная генетика, прикладная биология, технология ферментов, биоинженерия.

Все это свидетельствует о важном значении биотехнологии и широких возможностях её применения в различных отраслях народного хозяйства.

Рассмотрим наиболее приоритетные:

1. Повышение безопасности биотехнологического производства для человека и окружающей среды.

Требуется создание таких рабочих систем, которые будут функционировать только в строго контролируемых условиях. (Например, штаммы кишечной палочки, используемые в биотехнологии лишены надмембранных структур (оболочек), то есть они не могут существовать вне лабораторий или вне технологических установок.

2. Снижение доли отходов производственной деятельности человека.

Отходами называются побочные продукты, которые не используются человеком или другими компонентами биосфера и применение их нерентабельно или сопряжено с риском. Такие отходы накапливаются в помещениях или выбрасываются в окружающую среду. Следует стремиться к изменению соотношения полезный продукт/ отходы в пользу полезного продукта. Во-первых, нужно найти применение отходам. Во-вторых, использовать во вторичную переработку. В-третьих, создать рабочую систему, в которой отходы будут минимальными.

3. Снижение энергетических затрат на производство продукта (внедрение энергосберегающих технологий). Для этого необходимо использовать возобновляемые источники энергии. (Например, для трансформации солнечной энергии в формы доступные для современных силовых установок, создаются энергетические плантации быстрорастущих растений. Полученная биомасса используется для производства целлюлозы, биотоплива, биогумуса.)

4. Создание многокомпонентные растительных систем.

Необходимо отказаться от монокультуры и перейти к моногокомпонентным композициям. Включающим разные биотипы культивируемых организмов с разным ритмом развития, с разным отношением к динамике физико-химических факторов среды, к конкурентам, патогенам и вредителям.

5. Разработка новых препаратов для медицины. В настоящее время ведутся активные исследования в области медицины – создаются новые типы препаратов: целевые и индивидуальные.

Целевые препараты предназначены для устранения неконтролируемого деления, нарушения процессов апоптоза – направлены на любую молекулы или клеточную структуру участвующую в этих процессах. Индивидуальные препараты – будут применяться с учетом генетических особенностей пациентов, их предрасположенности к отрицательным побочным явлениям в отношении одних препаратов и чувствительность в отношении других. Такой индивидуальный терапевтический подход базирующийся на знании генома пациента называется фармакогеномика. Использование трансгенных растений привело к резкому сокращению применения инсектицидов и повышению урожайности. В настоящее время получены линии табака, которые, помимо устойчивости к ВТМ, резистентны к вирусу тыквенной мозаики. Были также получены растения резистентные к вирусу карликовости. Также получен и выращивается сорт тыквы, обладающий устойчивостью сразу к трем вирусам.

**4. Задачи биотехнологии.**

В современной биотехнологии используют биосистемы разных уровней (от молекулярно-генетического до биосферного) при этом создаются системы не встречающиеся в природе. Биологические системы используемые в биотехнологии вместе с небиологическими компонентами (оборудование, материалы, системы энергоснабжения, контроля и управления) принято называть – рабочими системами.

Задачи биотехнологии разработка и получение:

- 1) новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины;
- 2) микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей;
- 3) бактериальных удобрений и регуляторов роста растений, повышения плодородия почв;
- 4) новых с заданными свойствами высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным условиям сортов растений полученных методом генетической и клеточной инженерии;
- 5) кормовых добавок для повышения продуктивности животных;
- 6) новых методов биоинженерии для эффективной профилактики, диагностики и терапии болезней с-х ж-х;

7) новых технологий получения хозяйственно ценных для использования в пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности;

8) технологий глубокой и эффективной переработки с-х, промышленных и бытовых отходов, использованных сточных вод и газовоздушных выбросов для получения биогаза и высококачественных удобрений; производства дешевых и эффективных энергоносителей.

К основным разделам биотехнологии относятся микробиологический синтез, клеточная инженерия, генетическая инженерия.

Микробиологический синтез – синтез самых разнообразных веществ с помощью микроорганизмов. В настоящее время микроорганизмы применяют в различных высоких технологиях:

- для производства антибиотиков, кормового белка, аминокислот, БАСоединений;

Превращение одних веществ в другие называется – БИОКОНВЕРСИЕЙ.

При микробиологическом синтезе исходным сырьем служат разнообразные источники углерода (природные углеводороды, органические отходы), минеральные соли и атмосферный азот. В качестве микроорганизмов используют прокариоты (бактерии, актиномицеты) и грибы.

Применяя методы генетической и клеточной инженерии, современная биотехнология осуществляет широкое конструирование генетически модифицированных организмов (ГМО), в том числе микроорганизмов, растений и животных. В дальнейшем предполагается использование ГМО в природных условиях – в сельском хозяйстве, для биологической борьбы с вредителями. Однако возникает ряд этических и технологических проблем. При выпуске ГМО в окружающую среду они могут взаимодействовать с разнообразными организмами, сообществами и этот процесс не всегда поддается контролю и прогнозированию. В частности существует опасность внедрения искусственных генов в геном природных организмов в результате скрещивания ГМО и «диких» форм. Из-за возможности непредсказуемых последствий необходимы исследования, направленные на изучение безопасности ГМО.

Современная биотехнология развивается очень быстро в связи с тем что нет единой классификации её компонентов. Можно лишь выделить следующие типы технологий:

Технологии низкого уровня – традиционные основанные на использовании рабочих систем, полученных методом традиционной селекции. Технологии очистки сточных вод, получение биотоплива, некоторые виды микробиологического синтеза – характеризуются низкой научностью.

Технологии низкого уровня с минимальными затратами материальных ресурсов, энергии и человеческого труда называются – экстенсивными. (например, повышение плодородия почв путем вывоза на поля навоза, торфа и т.п. распахивают степи, вырубаются леса) При этом продуктивность системы мало отличается от продуктивности природных экосистем.

## **1. 2 Лекция № 2 (2 часа).**

**Тема: «Основные объекты биотехнологии и их народнохозяйственное значение»**

### **1.2.1 Вопросы лекции:**

1. Вирусы, бактерии, водоросли.
2. Лишайники, грибы, водные растения.
3. Высшие растения *in vivo* и *in vitro*.
4. Животные *in vivo* и *in vitro*.

### **1.2.2 Краткое содержание вопросов**

- 1. Вирусы, бактерии, водоросли.**

Объекты, используемые в биотехнологии разнообразны по своей структуре и биологическим характеристикам.

К объектам биотехнологии относятся: вирусы; бактерии и цианобактерии; водоросли; лишайники; грибы; водные растений; клетки растений и животных.

Вирусы - это объекты, геном которых представлен одной нуклеиновой кислотой ДНК или РНК, эта нуклеиновая кислота реплицируется в живых клетках, и используя их синтетический аппарат, заставляет клетки синтезировать специализированные частицы (вирионы), содержащие геном вируса и способные передавать его в другие клетки. *Значение вирусов.* Вирусы вызывают ряд опасных заболеваний человека (оспа, корь, полиомиелит, гепатит, СПИД, рак и т.п.), животных (ящур, чума), растений (мозаичную болезнь табака, томата, огурца, карликовость, увядание земляники и т.п.). Бактериофаги используются для лечения некоторых бактериальных заболеваний (дизентерии, холеры). В медицине широко используется интерферон – особый класс противовирусных белков, не обладающих токсичностью в отношении клеток. В настоящее время применяют готовый интерферон, или индукторы интерферона.

*Бактерии.* До конца 1970-х гг. термин «бактерия» служил синонимом прокариот, но в 1977 г. на основании данных молекулярной биологии прокариоты разделили на царства архебактерии и эубактерии (собственно бактерии).

*Значение бактерий.* Бактерии-сапрофиты играют большую роль - в круговороте веществ в природе, разрушая в экосистеме мертвый органический материал; - во всех биогеохимических циклах на нашей планете; - в круговороте химических элементов (углерода, железа, серы, азота, фосфора и др); - в процессах почвообразования, определяя плодородие почв. Многие микроорганизмы населяющие организм человека, животных участвуют в физиологических процессах и обеспечивают здоровье организма.

*Биотехнологические функции.* Бактерии применяют - при производстве различных веществ: уксуса (*Gluconobacter suboxidans*), молочнокислых продуктов (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*), микробных инсектицидов (*Bacillus thuringiensis*) и гербицидов, белков (*Methylomonas*), витаминов (*Clostridium* - рибофлавин); ферментов, гормонов. - при переработке отходов, получении бактериальных удобрений, растворителей и органических кислот, биогаза и фотоводорода; Благодаря быстрому росту и размножению, а также простоте строения, бактерии активно применяют в научных исследованиях по молекулярной биологии, генетике, биохимии.

Перспективные направления по использованию бактерий для очистки почвы, водоемов, загрязненных нефтепродуктами, а также для обогащения руд с помощью сероокисляющих бактерий.

*Водоросли* – наиболее древняя и разнородная группа организмов. Они обитают в водной среде, почве, на поверхности растений и в других местах. Большинство водорослей автотрофы - т.е. способны к фотосинтезу (т.к. содержат хлорофилл и могут использовать солнечный свет, но нередко их зеленая окраска маскируется другими пигментами.) Некоторые водоросли утратили способность к фотосинтезу и перешли на гетеротрофный тип питания. По строению тела различают одноклеточные, колониальные и многоклеточные водоросли. Клетка водорослей (похожа на растительные) – имеется клеточная стенка, одна крупная или несколько мелких вакуолей с клеточным соком, и хлоропласты (или их называют хроматофоры).

Хозяйственное значение водорослей заключается в использовании в качестве пищевого продукта и как сырья для получения различных ценных для человека веществ.

В пищу используют до 80 видов водорослей (ламинария, порфира, ульва, спируллина и т.д.) - они богаты минеральными веществами, особенно йодом. Одноклеточные водоросли выращивают в условиях мягкого теплого климата (Средняя Азия, Крым) в открытых бассейнах на специальной среде за 6-8 месяцев можно получить 50-60 т биомассы хлореллы с 1 га (люцерна с 1 га дает урожай 15-20 т) Хлорелла содержит 50% белка (а люцерна – 18%), 40% углеводов; 7-10% жиры, витамина А (в 20

раз больше), В<sub>2</sub>, К, РР и др микроэлементы. Варьируя составом питательной среды можно сдвинуть процессы биосинтеза в сторону накопления белков, или углеводов, или определенных витаминов. В клетках хлореллы есть антибиотик хлореллин. Водоросли служат пищей для рыб и водоплавающих птиц. Водоросли используют в качестве кормовой добавки животным (во Франции, Шотландии, Швеции, Норвегии, Исландии, Японии, Америке, Дании и на Русском Севере используют в качестве добавки или как самостоятельный корм для коров, лошадей, овец, птице). Водорослями можно заменить 50% сочных и 30% грубых кормов в суточном рационе. Водоросли служат удобрением. В Ирландии, Шотландии, Норвегии, Франции запахивают биомассу водорослей и обогащают почву фосфором, калием, йодом и большим количеством микроэлементов. Водоросли разлагаются быстрее, чем навозные удобрения и не засоряют её семенами сорняков, личинками вредных насекомых, спорами фитопатогенных грибов. В Израиле выращивают водоросль Dunaliella (дуналиелла) она способна синтезировать глицерол, и содержит β-каротин, т.о. культивируя эту водоросль можно получить глицерол, пигмент и белок. Красные водоросли (роды: анфельция, гелидиум, грацилярия) служат источником получения агар-агара, которое используют для приготовления пит. сред для культивирования микроорганизмов, для изготовления пастилы, мармелада, стабилизации консервов и сиропов, шоколадных напитков, мороженного; кожа, бумага или ткань обработанные агар-агаром становятся прочнее и приобретают блеск. Водоросли используют для получения йода. Некоторые водоросли служат индикаторными организмами при определении загрязненности водоёмов. Применяют для биологической очистки сточных вод, и для получения биомассы используемой в качестве топлива. В северных и умеренных широтах произрастает ламинария – морская капуста, содержащая много незаменимой аминокислоты – метионина, йода, углеводов, минеральных веществ, витаминов. Из ламинарии получают kleящее вещество – альгинит, которое используется в пищевой (при изготовлении консервов, соков), текстильной (ткани не выцветают, не промокают) промышленности, при производстве мелованной бумаги. Водоросли применяют в научных исследованиях по молекулярной биологии, генетике, генетической инженерии, биохимии и физиологии.

Перспективы: есть попытки использовать высокопродуктивные и неприхотливые водоросли, которые способны синтезировать белки, жиры, углеводы, витамины и способны поглощать вещества выделяемые человеком и животными для создания замкнутого круговорота веществ в обитаемых отсеках космического корабля.

## **2 Лишайники, грибы, водные растения.**

**Лишайники** – это симбиотические ассоциации микроскопических грибов и зеленных водорослей и/или цианобактерий, образующие слоевище (талломы) определенной структуры. Лишайники представляют собой симбиотическую группу состоящую из фотосинтезирующего организма (фитобиона – водоросли или цианобактерии) и гриба (микобиона)

**Значение лишайников.** Лишайники выносливы и могут существовать даже в Арктике и Антарктиде, где отсутствует другая растительность. Они являются пионерами почвообразования. Лишайники являются кормом для животных (ягель для оленей), его можно употреблять в пищу людям. Из рода Roccella получают лакмус. Они являются биоиндикаторами загрязнения окружающей среды диоксидом серы (сернистым газом). Из некоторых лишайников получают душистые вещества, используемые в парфюмерии (дубовый мох Evernia prunastri и др.)

**Грибы** – многочисленная группа организмов, до 100 тыс. видов. Грибы – гетеротрофы, они лишены хлорофилла, они усваивают минеральные вещества из окружающей среды, а органические получают в готовом виде.

Значение грибов.

1. В пищу – съедобные грибы. Ценный гриб – французский черный трюфель.

2. В пищевой промышленности – дрожжи, для приготовления уксуса, спиртных напитков.

3. Плесневые культуры - для приготовления сыров (рокфор, каламбер) соевого соуса (*Aspergillus oryzae*), вин (хереса).

4. В качестве галлюциногенов.

5. В медицине для производства антибиотиков (пенициллина, стрептомицина)

6. В сельском хозяйстве для получения пестицидов (препарат боверин).

Мухомор издревле использовали как пестицид.

7. Для получения таких веществ как: – лимонная кислота (аспергиллус);

- гиббереллины и цитокинины (физариум и ботритис);

- каротиноидов (астаксантин – придает красно-оранжевый цвет мякоти лососевых рыб – *Rhaffia rhodozima*);

- белок (*Candida, Saccharomyces lipolitica*).

Плесени вырабатывают ферменты используемые в промышленности (амилазы, пектиназы). Участвуют в симбиотических отношениях с корнями высших растений.

Отрицательное влияние грибов: снижают урожай сельскохозяйственных культур, вызывают заболевания человека, животных, растений, грибы-древоразрушители – разрушают деревья и древесные материалы.

*Водные растения.* Азолла растет в симбиозе с цианобактериями – анабена является ценным – органическим азотным удобрением. Представители семейства Рысковых (*Lemnaceae*) – служит кормом для водоплавающих птиц, рыб, ондатры, свиней, домашней птицы. Хорошо очищают воду и обогащают её кислородом.

### **3 Высшие растений *in vivo* и *in vitro*.**

Благополучие человека зависит от мира растений. 1,9 млрд. т употребляемого сухого вещества человечество получает из растений.

Необходимо искать новые способы повышения урожайности с-х культур т.к. повышение урожайности путем механизации, мелиорации и химизации привело к загрязнению окружающей среды, истощения энергетических ресурсов. Наиболее перспективными в этом направлении является применение клеточной и тканевой биотехнологии. Клеточная инженерия основана на использовании метода изолированных культур тканей на искусственных питательных средах.

В настоящее время растения используются как продуценты БАВ – сердечные гликозиды, стерины, каротиноиды, алкалоиды, витамины, хинины. БАВ принадлежат к продуктам вторичного обмена и называются вторичными метаболитами или вторичными продуктами биосинтеза.

Лекарственные растения – составляют 25% важнейших лекарственных средств. Среди которых, важное значение имеют наркотические препараты и стимулирующие вещества. Стимулирующие вещества содержат кофеин, самые известные *Camellia sinensis* (чай) и *Coffea Arabica* (кофе).

В растениях содержатся пиретрины – мощный инсектицид, выделяется из цветков *Chrysanthemum cinerariacfolium*. На природные перитрины у насекомых не возникает устойчивость, и кумулятивная токсичность. Из растений получают «тонкие ароматы» - вещества, используемые в качестве добавок при изготовлении духов, продуктов. (В США 1 кг жасминовой эссенции стоит 6 тыс. долларов и производится 20-30 кг в год, а 1 кг масла какао стоит 4 доллара и производится 20 тыс.т в год). Растения представляют интерес как источник химических соединений используемый в качестве лекарственного препарата. (Для создания нового лекарственного препарата необходимо 10 лет и 100 млн. долларов).

### **4 Животные *in vivo* и *in vitro*.**

Сейчас в биотехнологии широк используются животные, изолированные ткани и органы, культуры клеток. Культуры клеток служат для научных исследований: - изучения патогенеза болезней; - изучения влияния лекарственных, косметических препаратов, БАВ,

консервантов на морфологически и биохимические изменения в клетках; - для культивирования вирусов, получения вакцин; - клетки насекомых для получения энтомопатогенных препаратов, клетки животных для получения трансгенных особей, клонирования ценных пород животных; - на органных культурах изучается закономерности развития органа, сохранения жизнеспособности органа перед трансплантацией.

*Практическое применение изолированных клеток, органов, тканей разнообразно:*

В качестве продуцентов препаратов (ИФН); Для получения моноклональных антител; Для синтеза БАВ (соматотропина – гормон -регулятор роста, липопротеина – гормон – стимулятор расщепления жиров); Для изучения влияние низких температур на сохранность жизнеспособности ( в медицине для заместительной терапии при ожогах, культуру клеток эндотелия - для реконструкции стенок эндотелия).

Перспектива: в практических целях крупный рогатый скот, овец, свиней использовать в качестве биореакторов лекарственных веществ (пока это невозможно поскольку введение генов, отвечающих за синтез необходимых соединений сопровождается у трансгенных животных тяжелыми заболеваниями.

### **1. 3 Лекция №3 (2 часа).**

**Тема: «Биотехнология высших растений: культуры клеток»**

#### **1.3.1 Вопросы лекции:**

1. Культура клеток и тканей, краткая характеристика предмета.
2. Методы и условия культивирования изолированных тканей и клеток растений. Дедифференцировка как основа каллусогенеза.
3. Типы культур клеток и тканей. Общая характеристика каллусных клеток. Морфогенез в каллусных тканях.
4. Клональное микроразмножение растений и его практическое применение.

#### **1.3.2 Краткое содержание вопросов:**

##### **1. Культура клеток и тканей, краткая характеристика предмета.**

Клеточная биотехнология базируется на способности клеток к существованию и размножению *in vitro*, их totипотентности и регенерации. Клеточная инженерия позволяет выделять и культивировать ткани и клетки высших многоклеточных организмов. Культивирование тканей и клеток вне организма *in vitro* возможно в определенных условиях.

Клетки растений обладают свойством totипотентность (полноценность, информативность) – способность каждой растительной клетки давать начало новому организму.

Использование культур клеток может быть использовано для фундаментальных исследований - взаимодействие клеток в тканях, клеточная дифференцировка, морфогенез, механизм образования раковых клеток, реализация totипотентности клеток. А также для решения ряда практических задач: - селекция,- получения биологических метаболитов растительного происхождения, выращивание безвирусных растений.

История клеточной и тканевой инженерии растений.

1 этап 1892-1902 гг. – ученые Х. Фёхтинг (1892), К. Рехингер (1893), Г. Хаберланд (1902) первая попытка стимулировать рост растительных клеток и органов, помещенных на фильтровальную бумагу, пропитанную сахарозой.

- Х. Фёхтинг – предположил, что полярность существует не только у организма или органа, но и у клетки;

- К. Рехингер – определил минимальный размер сегмента, образующего каллус;
- Г. Хаберланд – сформулировал идеи о возможности культивировать изолированные клетки растений *in vitro*, и о totипотентности клеток растений.

2 этап (1902-1922 гг.) – создание первых питательных сред для культивирования тканей животных. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах оказались неуспешными.

3 этап (1922-1932 гг.) – становление метода культур корней растений. Американец В. Роббинс (1922) и немецкий ученый В. Котте независимо друг от друга показали возможность выращивания меристем кончиков корней томатов и кукурузы на синтетической питательной среде. Однако через определенное время растительные ткани погибали.

4 этап (1932-1940 гг.) французский ученый Р.Готре и американский ученый Ф. Уайт показали. Что при периодической пересадке на новую питательную среду кончики корней могут расти неограниченно долго.

5 этап (1940-1960 гг.) Ф. Скуг и С.Миллер открыли класс фитогормонов – цитокинов и доказали что он совместно с фитогормоном ауксином стимулирует деление клеток тканей паренхимы табака, лишенной приводящих пучков и камбия. В зависимости от соотношения фитогормонов можно – поддерживать рост каллусной ткани, усиливать деление экспланта, индуцировать морфогенез. В 1959 г был предложен метод выращивания больших масс клеточных супензий.

6 этап (1960-1975 гг.) - разработка Э. Коккингом (английский ученый Ноттингемского университета) метода получения ферментативным путем изолированных протопластов из корней и плодов томатов и культивирования их в контролируемых условиях. В 1970 г Э. Пауэр с сотр. - осуществили искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь создания соматических гибридов.

Ж. Морель (французский ученый) разработал метод клonalного микроразмножения растений *in vitro* с использованием меристемной культуры (меристема – образовательные ткани с активно делящимися клетками).

Еще одно важное достижение в развитии технологии культивирования изолированных тканей и клеток стало культивирование одиночных клеток с помощью ткани-«няньки». Этот метод был предложен Р.Г. Бутенко в 1969 г (сотрудником института физиологии растений им. К.А. Тимирязева).

7 этап -(1975 г по настоящее время) – продолжается быстрое развитие технологии *in vitro* и изучение биологии культивируемых объектов.

Разрабатываются: - методы мутагенеза и клеточной селекции, - получения гаплоидных растений; - совершенствуется метод глубинного культивирования клеток с использованием протопластов и векторов созданных на основе плазмид *Ti* и *Ri* - *Agrobacterium tumefaciens* и *A. Rhizogenes*. - разработан метод переноса генов двудольных растений.

## **2 Методы и условия культивирования изолированных тканей и клеток растений. Дедифференцировка как основа каллусогенеза.**

Существует несколько типов культур клеток и тканей растений, в зависимости от способа их получения, условий культивирования и происхождения.

1. Каллусная ткань – образуется при культивировании на плотной поверхности питательной среде содержащей агар.

Каллус – группа недифференцированных клеток, возникших *in vitro* или *in vivo* путем неорганизованной пролиферации. Каллус («мозоль») может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) в условиях пробирки, так и на растениях при поранении.

Н. Кренке установил, что каллусная ткань в интактном растении выполняет следующие функции: - защитные – защищает места повреждений; - запасные – запасает питательные вещества, синтез вторичных соединений; - регенерационные – регенерация утраченных органов, корней, побегов. Каллусную ткань в условия *in vitro* можно получить практически из любой живой ткани растений. В основном каллусы имеют желтоватый

цвет, реже светло-зеленый, очень редко интенсивно-зеленый (у каллуса мандрограмы). Темно-коричневая окраска возникает при старении клеток и связана с накоплением окисленных фенольных соединений, для предотвращения процесса старения в питательную среду вносят антиоксиданты.

Каллусная ткань обычно аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, хотя может быть разной по плотности, в зависимости от происхождения и условий выращивания.

По классификации Р.Г. Бутенко существуют 3 типа каллусной ткани: - рыхлая, сильно распадающиеся на отдельные мелкие агрегаты и состоящая из сильно оводненных клеток; - средней плотности, с хорошо выраженным меристематическими очагами; - плотная, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы. Любой тип каллусной ткани можно превратить в другой используя для этого следующие приемы: - заменяя один ауксин (фитогормоны – ИУК, НУК, 2,4-Дихлорфеноксикусовая кислота (2,4-Д) – активизирующие рост стеблей и корней, стимулирующие рост стеблей у проростков) на другой; - изменяя концентрацию ауксина в питательной среде; - увеличивая или уменьшая концентрацию соли хлорида кальция в питательной среде; - добавляя в питательную среду ферменты (если необходимо получить каллусную ткань рыхлого типа).

Обязательное условия дедифференцировка растительных клеток и превращения их в каллусные присутствие в питательной среде 2 фитогормонов: ауксинов и цитокинов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клеток, подготавливающий её к делению, а цитокины – пролиферацию дедифференцированных клеток.

Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня без верхушки или другой растительный эксплантаант состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то каллусная ткань не образуется. Это связано с тем, что дифференцированные клетки не способны к делению. Для того чтобы дифференцированные клетки приобрели способность к делению необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка т.е. чтобы клетка возвратилась в меристематическое состояние.

Каллусные клетки сохраняют многие физиологические особенности исходной ткани (например: морозостойкость, устойчивость к температуре, засолению) а главное способность к синтезу вторичных метаболитов.

При длительном культивировании у каллусных клеток появляются свои, характерные только для них особенности:

- клетки высших растений образуют специфическую популяцию соматических клеток относящихся к типу неполовых. Характерной особенностью неполовых клеток – физиологическая асинхронность и генетическая гетерогенность.

Физиологическая асинхронность – заключается в том, что в данный момент времени клетки находятся в разных фазах роста: одни делятся, другие растут, третьи стареют. Поэтому физиологическое состояние такой популяции принято оценивать по состоянию большинства клеток.

Причины асинхронности разные:- особенности вида, сорта, генотипа индивидуального растения;- стрессы культивирования (неоптимальная среда для данного вида клеток);- изменение баланса эндогенных гормонов и концентрации в среде экзогенных гормонов в течение выращивания;- генетическая гетерогенность клеток и клонов;- аномалия митотического цикла клеток *in vitro*;- физические факторы (температура, свет, аэрация).

Асинхронность – устойчивое свойство популяции каллусных клеток. Генетическая гетерогенность – свойство клеток соматической популяции (нестабильность генома и их генетическая гетерогенность). Генетически стабильными считаются только клетки меристематической ткани. В клетках остальных тканей при культивировании могут возникнуть полипloidия, анеупloidия, хромосомные aberrации, генетические мутации.

Генетическая гетерогенность является необходимым условием существования клеток и служит основой для адаптации.

Причины генетической гетерогенности: - генетическая гетерогенность исходного материала; - действие компонентов среды. Экзогенные гормоны и стимуляторы могут оказывать мутагенное действие. Ауксины, входящие в состав питательной среды – являются мутагенами; цитокины - способствуют полиплоидизации клеток; - длительное культивирование, при котором накапливаются генетически измененные каллусные клетки.

Еще одно свойство может быть у некоторых каллусных клеток - горононезависимость. Несмотря на то, что каллусные ткани большинства растений образуются в присутствии гормонов (исключение незрелые ростки пшеницы – в присутствии ауксинов, но без цитокинов и семядоли подсолнечника они культивируются в среде с цитокинами, но без ауксинов).

### **3. Типы культур клеток и тканей. Общая характеристика каллусных клеток. Морфогенез в каллусных тканях.**

В зависимости от способа культивирования различают каллусные и суспензионные культуры клеток. Каллусные культуры клеток получают путем поверхностного культивирования, а суспензионные – глубинным культивированием.

Суспензионные культуры – это отдельные клетки, выращиваемые во взвешенном состоянии в жидкой среде. Это относительно гомогенная культура клеток, которую легко можно подвергнуть воздействию химических веществ. Её можно получать 2 способами: 1) путем переноса в жидкую среду каллусной ткани, предварительно выращенной на твердой агаризованной питательной среде. Т.е. каллусную ткань используют в качестве посевного материала. Каллусная ткань должна быть рыхлой и легко распадаться на отдельные клетки. 2) непосредственно из первичного эксплантанта (лист, стебель, корень и т.п.). Для этого применяют ферменты (например, пектиназу). Вначале на поверхности эксплантанта образуется каллусная ткань, а затем от неё отделяются клетки и клеточные агрегаты, в результате образуется клеточная суспензия.

Обязательное условия культивирования клеточных суспензий – постоянное перемешивание или встряхивание среды. Если клеточная суспензия находится в неподвижном состоянии, то образуется каллусная ткань. Деление суспензионных клеток поддерживается наличием в среде гормонов ауксинов и цитокинов.

При промышленном культивировании суспензионных культур применяют открытые или закрытые системы с периодическим или проточным режимом выращивания клеток. Закрытая система - клеточная среда не обновляется до конца выращивания - периодическая культура. В открытой системе – питательную среду частично меняют на свежую – непрерывный режим культивирования или проточный. И при замене питательной среды вместе со средой отбирается часть суспензионных клеток.

Для работы с клеточными культурами необходимо знать их характеристики: - жизнеспособность (определяют по окрашиванию красителями метиленовым синим или синькой Эванса – живые клетки не окрашиваются из-за непроницаемости клеточных мембран, а мертвые окрашиваются в синий цвет); - плотность клеток в суспензии (число клеток определяют в камере Фукса-Розенталя или Горяева под микроскопом после макерации клеток. В качестве макерирующего вещества применяют 10-20% хромовую кислоту); - степень агрегированности, различают: - мелкоагрегированную, среднеагрегированную, крупноагрегированную суспензионную культуру . Изолированный протопласт – содержимое растительной клетки окруженной плазмалеммой. Целлюлозная стенка отсутствует. Изолированный протопласт один из наиболее ценных объектов биотехнологии, поскольку в них легко вводить генетическую информацию из органелл и клеток других растений, прокариот, клеток животных. Метод изолированных протопласт используется для создания гибридных клеток.

Есть 2 метода выделения протопластов: 1) механический - в результате механического повреждения ткани; 2) ферментативный – удаление клеточной стенки за счёт поэтапного использование для её разрушения ферментов: целлюлозы, гемицеллюлозы, пектиназы.

Выделить протопласти можно из клеток растений, каллусных клеток и супензионных культур. Для выделения протопластов необходимо тщательно подбирать: - концентрацию ферментов, и их соотношения; - времени обработки; - осмотический стабилизатор. Культивирование изолированных протопластов проводят в той же питательной среде, что и изолированных клеток и тканей.

После завершения дедифференцировки дальнейшее развитие каллусной клетки может идти разными путями: Первый путь – вторичная регенерация целого организма, возможна дифференцировка на уровне клеток, тканей и органов. Второй путь – утрата клеткой способности к вторичной дифференцировке и регенерации растений, стойкая дедифференцировка, приобретение способности расти на среде без гормонов т.е. превращение в опухоловую. Третий путь – нормальную путь развития каллусной клетки, который заканчивается её старением и отмиранием.

Наибольший интерес представляет первый путь, который представляет морфогенные процессы. *Морфогенез каллусных тканей* – это возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток. Они имеют определенное строение и выполняют определенные функции. Например, используются для образования эпикальных – клеток, в которых запасаются вторичные метаболиты. Это самый простой путь дифференцировки каллусных клеток. Сложная гистологическая дифференцировка – это образование в каллусе разных тканей: элементов ксилемы, флоэмы, трихом, волокон и т.д. Самым сложным видом вторичной дифференцировки является органогенез (образование органов) и соматический эмбриогенез (образование из соматических клеток биполярных зародышевых структур). Основными стимулами морфогенеза каллусных тканей является изменение соотношения гормонов в питательной среде и сам процесс изоляции клетки от организма, дополнительными стимулами являются наличие в среде нитрата серебра, нитрата аммония, некоторых аминокислот (пролин, тирозин, серин), полиаминов (путресцин, спермидин), в качестве стимулирующего вещества могут выступать манит, сорбит. На морфогенез оказывает влияние свет, морфогенный каллус чаще образуется на синем свету, чем на белом или красном.

#### **4. Клональное микроразмножение растений и его практическое применение.**

Использование культур клеток позволило создать новый метод вегетативного размножения – клональное микроразмножение. Это способ получения растений в условиях *in vitro* неполовым путем генетически идентичных исходному материалу.

Метод клонального размножения имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными: получение генетически однородного посадочного материала; высокий коэффициент размножения; сокращение продолжительности селекционного процесса; быстрый переход растений от ювенильной стадии к продуктивной стадии; размножение растений, трудно размножающихся традиционными способами; автоматизация процесса выращивания; возможность проведения работ в течение года.

Начало методу клонального микроразмножению положил французский ученый Ж.Морель – он получил первые растения-регенераты орхидей. А в нашей стране Р.Г. Бутенко изучил условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы, фрезии и предложил промышленные технологии. Область применения клонального микроразмножения постоянно расширяется. Можно применять этот метод для выращивания взрослых древесных пород *in vitro* (особенно хвойных и исчезающих пород).

Процесс клонирования можно разделить на 4 стадии: 1) Выбор растения-донора, изолирование эксплантаントв и получение стрельной хорошо растущей культуры; 2)

собственно микроразмножение это когда получается максимальное количество микропобегов; 3) ускорение размножение побегов и их адаптация к почвенным условиям; 4) выращивание растений в условиях теплицы и подготовка и посадка их в грунт.

Микроразмножение можно проводить следующими методами: активацией размножения уже существующих в растений меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки и т.п.); индукция возникновения адвентивных почек тканями экспланта; индукцией соматического эмбриогенеза; дифференциацией адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Метод активации развития уже существующих в растении меристем является основным, он основывается на снятии апикального доминирования . Снятие апикального доминирования возможно 2 путями: удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега в условиях пробирки на безгормональной среде; добавлением в питательную среду цитокиновых веществ стимулирующих развитие многочисленных пазушных побегов.

Этот метод нашел широкое применение для производства безвирусного посадочного материала различных растений.

Применение метода активации развития уже существующих в растении меристем позволила получить из 1 меристемы картофеля более  $10^5$  растений в год, с получением в пробирках микроклубней - ценного безвирусного семенного материала. Для картофеля этот метод поставлен на промышленную основу.

Каждый из методов имеет преимущества. Например, метод индукции возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта - основан на способности изолированных частей растений при благоприятных условиях восстанавливать недостающие органы и регенерировать целое растение. Это один из наиболее распространенных методов микроразмножения высших растений. Метод соматического эмбриогенеза используется для размножения растений семейства орхидея, некоторых злаковых, древесных пород. Преимущества этого метода в том, что не требуется подбирать условия укоренения и адаптации пробирочных растений, так как соматические зародыши представляют собой полностью сформированные растенници. При использовании специальной техники их капсулирования из этих эмбрионов можно получить искусственные семена. Метод дифференциации адвентивных почек в первичной пересадочной каллусной ткани не используется для получения посадочного материала *in vitro*. Однако применение этого метода дает возможность селекционерам проводить отбор по хозяйственно важным признакам. Основное преимущество клonalного микроразмножения заключается в возможности получения генетически однородного безвирусного посадочного материала.

#### **1.4. Лекция №4 (2 часа).**

**Тема: «Генетическая инженерия животных»**

##### **1.4.1 Вопросы лекции:**

1. Трансформация животного генома.
2. Достижения генетической инженерии.
3. Перспектива

##### **1.4.2 Краткое содержание вопросов:**

**1. Трансформация животного генома.** Одним из носителей для введения чужеродной ДНК в животную клетку являются векторы на основе ДНК-содержащих вирусов (папилломы и ретровирусы). Они легко проникают в клетку и встраиваются в её ДНК.

Все генно-инженерные работы с клетками животных можно разделить на две группы: эксперименты с соматическими клетками; эксперименты по трансформации половых клеток.

*Генетическая трансформация соматических клеток животных.* Культуры трансформированных клеток животных используют для получения различных веществ. Хотя клетки животных при массовом выращивании менее экономичны чем клетки бактерий и дрожжей, они обладают существенным преимуществом – способностью осуществлять модификации белков - продуктов генов млекопитающих. (например, присоединение к белкам углеводов или липидов - бактериальная клетка не способна). Клетки млекопитающих используются и для создания вакцин, в том числе ДНК-вакцин, когда в организм вводится ген, отвечающий за синтез определенного белка – протективного антигена.

*Генетическая трансформация половых клеток животных.* Если вводить в клетки многоклеточного организма ДНК, то результатом трансформации будет изменение свойств небольшого числа клеток, которые приобрели новый ген. В этом случае животное будет химерным (т.е. клетки разных тканей будут иметь разный генотип). Следовательно, для изменения свойств всего организма следует изменять геном половых клеток или зиготы, которые передадут новые свойства потомкам.

Существует 2 способа создания трансгенных животных: микроинъекция чужеродной ДНК; введение генетической конструкции в эмбриональные стволовые клетки.

Микроинъекция чужеродной ДНК – впервые американский ученый Д. Гордон в 1980 г ввел в оплодотворенную яйцеклетку мыши рекомбинантную плазмиду. Микроинъекцию клонированных генов проводят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки мыши. Чаще выбирают мужской пронуклеус. После инъекции яйцеклетку немедленно трансплантируют в яйцевод приемной (суррогатной) матери или оставляют в культуре до стадии бластоцисты после чего имплантируют.

Для отбора трансгенных животных (несущих введенный ген) проводят молекулярно-генетический анализ родившегося потомства. Скрещивая трансгенных животных можно получить чистые (гомозиготные) трансгенные линии. Недостаток технологии создания трансгенных животных путем микроинъекции генетических конструкций в пронуклеус яйцеклетки является её трудоемкость и малоэффективность (полного развития достигает 1-5 %зигот).

Введение генетических конструкций в эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). ЭСТ обычно получают из бластоцист. Когда число клеток (blastomer) эмбриона не превышает 8, они являются недифференцированными, плuriпотентными (totipotentными) т.е. способны дифференцироваться в любые типы клеток, включая клетки зародышевой линии каждая из них дает начало зародышевой линии и каждая может дать начало новому организму. Эти клетки можно культивировать ин витро и после введения в них необходимого трансгена ввести в другой эмбрион на стадии бластоцисты, а затем имплантировать в матку суррогатной матери, производящей потомство. Скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных животных.

В отличие от предыдущего метода этот метод позволяет проанализировать встраивание трансгена в геном клетки на стадии бластоцисты и проверить его экспрессию, что дает возможность выбрать линию ЭСК с наилучшими свойствами. Часть клеток можно заморозить в жидком азоте и хранить многие годы для последующего использования. Такой путь получения трансгенных животных выгоднее предыдущего (из зиготы). Бластоцисты можно получить нехирургическим путем и трансплантировать суррогатным матерям для создания трансгенных животных -основателей трансгенных линий. Создание трансгенных животных – очень сложный процесс и трудоемкий. (По

статистике 1 трансгенное животное можно получить на 40 инъецированных зигот мыши, на 100 зигот овцы, на 1500 зигот коровы.

**Клонирование животных.** Клоном называется популяция клеток или организмов – потомков одной клетки или организма, полученных неполовым путем. Т.о. все особи в клоне имеют идентичный набор генов и должны быть точной копией взятого для размножения экземпляра. У животных можно получить подобные клоны в том случае, когда используются объекты размножающиеся путем партеногенеза (т.е. бесполым). В нашей стране ютили выполнены работы по клонированию на шелкопряде (партеноклоны мужские давали на 20% больше шелка, чем женские особи).

## **2. Достижения генетической инженерии.**

Трансгенные животные являются удобной моделью для изучения болезней человека. И испытания различных терапевтических препаратов. Разрабатываются методы генетической терапии. Использование трансгенных животных в качестве биореакторов. Самая мощная белоксинтезирующая система находится в молочной железе. Если поставить гены чужих белков под контроль казеинового промотора, то экспрессия этих генов будет мощной и стабильной, а белок будет накапливаться в молоке. Такие трансгенные животные, секреции в молоко гормоны, ферменты, антитела, факторы свертывания крови роста и др. уже начинают использоваться как биореакторы, т.е. продуценты биологически активных лекарственных белков человека. ( В Англии в 1988 г получили трансгенных овец продуцирующих молоко с фактором свертывания крови. В последующем были созданы трансгенные мыши, кролик, овцы, козы, свиньи, коровы в молоке которых секретируется белки человека – антитрипсин, антитромбин, белок С, сывороточный альбумин, различные моноклональные антитела и др. Уже получены коровы в молоке которых содержится лактоферрин – белок применяемый для профилактики гастроэнтеритов у людей с низким иммунным статусом.

## **3. Перспектива**

**Перспектива** – создание животных – продуцентов белков паутины пауков, поскольку прочность нити паутины превосходит прочность стальных канатов. Так, перенеся в гены козы ген паука, отвечающий за выработку белка паутины, американские и канадские ученые получили трансгенных животных дающих «БИОСТАЛЬ» молоко. Содержащие белок по прочности превосходящий металл. Трансгенные животные с выключенными генами - генный нокаут – это животные с направлено разрушенными генами, модель для изучения функции различных генов. Трансгенные животные – источники органов для пересадки человеку. Удобным донором являются свиньи. Для создания такой модели необходимо у животных отключить гены гистонесовместимости. В январе 2002 г в США сообщили о рождении пометов трансгенных животных с «отключенными» генами гистонесовместимости. Итак, создание трансгенных животных представляет интерес не только для фундаментальных исследований, но и для практического использования.

### **1. 5 Лекция №5 (2 часа).**

**Тема: «Основные методы, используемые в промышленной биотехнологии»**

#### **1.5.1 Вопросы лекции:**

1. Основные направления развития промышленной биотехнологии
2. Генная и клеточная инженерия
3. Биотехнология ферментов
4. Экологическая биотехнология

#### **1.5.2 Краткое содержание вопросов:**

- 1. Основные направления развития промышленной биотехнологии.**

Биотехнология как наука является важнейшим разделом современной биологии, которая, как и физика, стала в конце XX в. одним из ведущих приоритетов в мировой науке и экономике.

Всплеск исследований по биотехнологии в мировой науке произошел в 80-х годах, когда новые методологические и методические подходы обеспечили переход к эффективному их использованию в науке и практике и возникла реальная возможность извлечь из этого максимальный экономический эффект. По прогнозам, уже в начале 21 века биотехнологические товары будут составлять четверть всей мировой продукции.

В нашей стране значительное расширение научно-исследовательских работ и внедрение их результатов в производство также было достигнуто в 80-е годы. В этот период в стране была разработана и активно осуществлялась первая общенациональная программа по биотехнологии, были созданы межведомственные биотехнологические центры, подготовлены квалифицированные кадры специалистов-биотехнологов, организованы биотехнологические лаборатории и кафедры в научно-исследовательских учреждениях и вузах.

Однако в дальнейшем внимание к проблемам биотехнологии в стране ослабло, а их финансирование сокращено. В результате развитие биотехнологических исследований и их практическое использование в России замедлилось, что привело к отставанию от мирового уровня, особенно в области генетической инженерии.

Что касается более современных биотехнологических процессов, то они основаны на методах рекомбинантных ДНК, а также на использовании иммобилизованных ферментов, клеток или клеточных органелл. Современная биотехнология — это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

В рамках изучаемого курса можно выделить 3 основных части:

1. Промышленная биотехнология, где рассматриваются общие принципы осуществления биотехнологических процессов, происходит знакомство с основными объектами и сферами применения биотехнологии, рядом крупномасштабных промышленных биотехнологических производств, использующих микроорганизмы.

2. Клеточная инженерия. Основная цель этого раздела — знакомство с методами ведения культуры клеток и практическим использованием этих объектов. В рамках этого раздела выделяют культивирование растительных клеток и методы культивирования животных клеток, так как подходы к культивированию этих объектов различаются в силу их принципиальных биологических различий. Клеточная биотехнология обеспечила ускоренное получение новых важных форм и линий растений и животных, используемых в селекции на устойчивость, продуктивность и качество; размножение ценных генотипов, получение ценных биологических препаратов пищевого, кормового и медицинского назначения

3. Генная инженерия. Высшим достижением современной биотехнологии является генетическая трансформация, перенос чужеродных генов и других материальных носителей наследственности в клетки растений, животных и микроорганизмов, получение трансгенных организмов с новыми или усиленными свойствами и признаками. По своим целям и возможностям в перспективе это направление является стратегическим. Оно позволяет решать коренные задачи селекции биологических объектов на устойчивость, высокую продуктивность и качество продукции при оздоровлении экологической обстановки во всех видах производств. Однако для достижения этих целей предстоит преодолеть огромные трудности в повышении эффективности генетической трансформации и прежде всего в идентификации генов, создании их банков клонирования, расшифровке механизмов полигенной детерминации признаков и свойств биологических объектов, обеспечении высокой экспрессии генов и создании надежных векторных систем. Уже сегодня во многих лабораториях мира, в том числе и в России, с

помощью методов генетической инженерии созданы принципиально новые трансгенные растения, животные и микроорганизмы, получившие коммерческое признание.

В молекулярной биологии использование биотехнологических методов позволяет определить структуру генома, понять механизм экспрессии генов, смоделировать клеточные мембранные с целью изучения их функций и т.д. Конструирование нужных генов методами генной и клеточной инженерии позволяет управлять наследственностью и жизнедеятельностью животных, растений и микроорганизмов и создавать организмы с новыми полезными для человека свойствами, ранее не наблюдавшимися в природе.

Микробиологическая промышленность в настоящее время использует тысячи штаммов различных микроорганизмов. В большинстве случаев они улучшены путем индуцированного мутагенеза и последующей селекции. Это позволяет вести широкомасштабный синтез различных веществ.

Некоторые белки и вторичные метаболиты могут быть получены только путем культивирования клеток эукариот. Растительные клетки могут служить источником ряда соединений - атропин, никотин, алкалоиды, сапонины и др. Клетки животных и человека также продуцируют ряд биологически активных соединений. Например, клетки гипофиза - липотропин, стимулятор расщепления жиров, и соматотропин - гормон, регулирующий рост.

Созданы перевиваемые культуры клеток животных, производящие моноклональные антитела, широко применяемые для диагностики заболеваний. В биохимии, микробиологии, цитологии несомненный интерес вызывают методы иммобилизации как ферментов, так и целых клеток микроорганизмов, растений и животных. В ветеринарии широко используются такие биотехнологические методы, как культура клеток и зародышей, овогенез *in vitro*, искусственное оплодотворение. Все это свидетельствует о том, что биотехнология станет источником не только новых продуктов питания и медицинских препаратов, но и получения энергии и новых химических веществ, а также организмов с заданными свойствами.

## **2. Генная и клеточная инженерия.**

Генная и клеточная инженерия – являются важнейшими методами (инструментами), лежащими в основе современной биотехнологии. Методы клеточной инженерии направлены на конструирование клеток нового типа. Они могут быть использованы для воссоздания жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток, для объединения целых клеток, принадлежавших различным видам с образованием клетки, несущей генетический материал обеих исходных клеток, и других операций.

Генно-инженерные методы направлены на конструирование новых, не существующих в природе сочетаний генов. В результате применения генно-инженерных методов можно получать рекомбинантные (модифицированные) молекулы РНК и ДНК, для чего производится выделение отдельных генов (кодирующих нужный продукт), из клеток какого-либо организма. После проведения определенных манипуляций с этими генами осуществляется их введение в другие организмы (бактерии, дрожжи и млекопитающие), которые, получив новый ген (гены), будут способны синтезировать конечные продукты с измененными, в нужном человеку направлении, свойствами. Иными словами, генная инженерия позволяет получать заданные (желаемые) качества изменяемых или генетически модифицированных организмов или так называемых «трансгенных» растений и животных.

Наибольшее применение генная инженерия нашла в сельском хозяйстве и в медицине.

Люди всегда задумывались над тем, как можно научиться управлять природой, и искали способы получения, например, растений с улучшенными качествами: с высокой урожайностью, более крупными и вкусными плодами или с повышенной холодаустойчивостью. С давних времен основным методом, который использовался в этих

целях, была селекция. Она широко применяется до настоящего времени и направлена на создание новых и улучшение уже существующих сортов культурных растений, пород домашних животных и штаммов микроорганизмов с ценными для человека признаками и свойствами.

Селекция строится на отборе растений (животных) с выраженными благоприятными признаками и дальнейшем скрещивании таких организмов, в то время как генная инженерия позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат клетки. Важно отметить, что в ходе традиционной селекции получить гибриды с искомой комбинацией полезных признаков весьма сложно, поскольку к потомству передаются очень большие фрагменты геномов каждого из родителей, в то время как генно-инженерные методы позволяют работать чаще всего с одним или несколькими генами, причем их модификации не затрагивают работу других генов. В результате, не теряя других полезных свойств растения, удается добавить еще один или несколько полезных признаков, что весьма ценно для создания новых сортов и новых форм растений. Стало возможным изменять у растений, например, устойчивость к климату и стрессам, или их чувствительность к насекомым или болезням, распространённым в определённых регионах, к засухе и т.д. Учёные надеются даже получить такие породы деревьев, которые были бы устойчивы к пожарам. Ведутся широкие исследования по улучшению пищевой ценности различных сельскохозяйственных культур, таких как кукуруза, соя, картофель, томаты, горох и др.

Исторически, выделяют «три волны» в создании генно-модифицированных растений:

Первая волна – конец 1980-х годов – создание растений с новыми свойствами устойчивости к вирусам, паразитам или гербицидам. В растениях «первой волны» дополнительно вводили всего один ген и заставляли его «работать», то есть синтезировать один дополнительный белок. «Полезные» гены «брали» либо у вирусов растений (для формирования устойчивости к данному вирусу), либо у почвенных бактерий (для формирования устойчивости к насекомым, гербицидам).

Вторая волна – начало 2000-х годов – создание растений с новыми потребительскими свойствами: масличные культуры с повышенным содержанием и измененным составом масел, фрукты и овощи с большим содержанием витаминов, более питательные зерновые и т.д.

В наши дни учёные создают растения «третьей волны», которые в ближайшие 10 лет появятся на рынке: растения-вакцины, растения-биореакторы для производства промышленных продуктов (компонентов для различных видов пластика, красителей, технических масел и т.д.), растения - фабрики лекарств и т.д.

Генно-инженерные работы в животноводстве имеют другую задачу. Вполне достижимой целью при современном уровне технологии является создание трансгенных животных с определённым целевым геном. Например, ген какого-нибудь ценного гормона животного (например, гормона роста) искусственно внедряется в бактерию, которая начинает продуцировать его в больших количествах. Еще один пример: трансгенные козы, в результате введения соответствующего гена, могут вырабатывать специфический белок, фактор VIII, который препятствует кровотечению у больных, страдающих гемофилией, или фермент, тромбокиназу, способствующий рассасыванию тромба в кровеносных сосудах, что актуально для профилактики и терапии тромбофлебита у людей. Трансгенные животные вырабатывают эти белки намного быстрее, а сам способ значительно дешевле традиционного.

В конце 90-х годов XX в. учёные США вплотную подошли к получению сельскохозяйственных животных методом клонирования клеток эмбрионов, хотя это направление нуждается еще в дальнейших серьезных исследованиях. А вот в ксенотрансплантации – пересадке органов от одного вида живых организмов другому, - достигнуты несомненные результаты. Наибольшие успехи получены при использовании

свиней, имеющих в генотипе перенесенные гены человека, в качестве доноров различных органов. В этом случае наблюдается минимальный риск отторжения органа.

Учёные также предполагают, что перенос генов поможет снизить аллергию человека к коровьему молоку. Целенаправленные изменения в ДНК коров должны привести также к уменьшению содержания в молоке насыщенных жирных кислот и холестерина, что сделает его еще более полезным для здоровья. Потенциальная опасность применения генетически модифицированных организмов выражается в двух аспектах: безопасность продовольствия для здоровья людей и экологические последствия. Поэтому важнейшим этапом при создании генно-модифицированного продукта должна быть его всесторонняя экспертиза во избежание опасности того, что продукт содержит протеины, вызывающие аллергию, токсичные вещества или какие-то новые опасные компоненты.

### **3. Биотехнология ферментов.**

Существуют особые белки – ферменты (энзимы), выполняющие в живых организмах роль катализаторов, что позволяет ускорять превращение веществ, образующихся при метаболизме и поступающих в организм для обеспечения энергией, обновления клеточных структур, участия в регулировании биохимических процессов применительно к изменяющимся условиям. Биотехнология ферментов изучает происходящие процессы и предлагает современные варианты их решения.

Основными достоинствами ферментов в сравнении с неорганическими катализаторами являются: высокая нетоксичность, возможность работы в мягких условиях, без высоких температур, что снижает затраты топлива, а использование доступного сырья (часто отходов), делает их использование экономически и экологически выгодным. На сегодня объемы производства ферментов вышли на 3 место, немного уступив производству аминокислот и антибиотиков. Хотя по данным энзимологии охарактеризовано до 2000 ферментов, но в промышленности активно используется не более 30 ферментов.

Прежде всего, почти 60% от общего объема, приходится на гидролазы – щелочные, нейтральные протеазы, используемые в производстве моющих синтетических средств в качестве дегидрентов. На долю гликозидаз приходится до 30%, чаще всего они незаменимый компонент в производстве соков (фруктовых, овощных), кондитерских изделий.

Биотехнология ферментов широко применяется в медицинской, текстильной, кожевенной, целлюлозно-бумажной, химической промышленности в следующих технологических процессах:

амилаз в гидролизе крахмала до декстринов, глюкозы и малтозы в хлебопечении, спиртовой, пивоваренной промышленности, в получении глюкозы, патоки;

липаз в гидролизе жиров/масел в медицинской, пищевой промышленности, бытовой химии, жилищно-коммунальном и сельском хозяйстве;

пектиназ в гидролизе галактуронана, осветлении фруктовых соков, вина;

глюкоизомераза в изомеризации глюкозы во фруктозу в хлебопечении, кондитерской, безалкогольной, ликероводочной промышленности;

пептидогидролаза в гидролизе белков для получения аминокислот, в производстве сыра, смягчения мясных/рыбных изделий, выделки кожи, для активизации пищеварения;

целлюлазы в гидролизе до глюкозы целлюлозы в производстве пищевых/кормовых препаратов, глюкозо-фруктозных сиропов, этанола в спиртовой, пивоваренной, пищеконцентратной промышленности.

Основными источниками ферментов являются природные объекты, например: проросшее зерно, латекс/сок некоторых растений, ткани/органы животных (сычуг КРС, семенники половозрелых животных). Но практически неограниченным источником

питания служат микроорганизмы и грибки, способные за счет размножения самостоятельно наращивать объемы производства ферментов.

### **3. Молекулярная биотехнология.**

Одним из основных направлений развития биотехнологии еще с глубокой древности всегда было производство коммерческих продуктов, образованных в результате жизнедеятельности микроорганизмов. В наши дни определение биотехнологии звучит по-другому – применение научных, инженерных принципов в переработке материалов при помощи живых организмов и создании товаров, услуг.

Исторически становление молекулярной биотехнологии произошло, когда при производстве пива были впервые использованы дрожжи, а для получения сыра, кисломолочных продуктов – бактерии. Впервые термин биотехнология был упомянут в 1917 в описании венгерским инженером Эреки процесса выращивания свиней с использованием сахарной свеклы. Как определял биотехнологию сам инженер – это отдельная избирательность или совокупность всех видов работ, во время которых при помощи живых организмов из исходных сырьевых материалов производят различные продукты.

На сегодня биотехнологию четко и необратимо связывают с исследованиями в сфере промышленного производства товаров, услуг при участии/использовании живых организмов, целых биологических систем, процессов основанных на микробиологии, биохимии, химической инженерии. Именно в создании коммерческого продукта и прослеживается тесная связь молекулярной биотехнологии с экономикой. Более подробно промышленный биотехнологический процесс описан в Молекулярной биотехнологии Глика, Пастернака.

Обычно в производстве коммерческих продуктов при помощи микроорганизмов, существует три ключевых этапа:

- Первоначальная обработка сырья для дальнейшего его использования микроорганизмами как источника питательных веществ;
- Ферментация/биотрансформация, для чего рост микроорганизма в процессе ферментации происходит в большом биореакторе, и образование из него при помощи биотрансформации нужного метаболита: антибиотиков, аминокислот, белков;
- Конечной обработкой нужное вещество очищается от примесей культуральной среды, клеточной массы.

Одной из целей исследований любого центра молекулярной биотехнологии является повышение эффективности на каждом этапе, поиска микроорганизмов, необходимых в получении нужных веществ, что в свое время позволило усовершенствовать инструментальный контроль за процессом ферментации и расширить возможности культивирования в крупных масштабах, тем самым сделать производство некоторых продуктов эффективнее. Для чего молекулярная биология в создании отдельных коммерческих продуктов широко использует разработки и данные биотехнологических исследований различных областей науки.

### **4. Экологическая биотехнология.**

Одним из направлений развития биотехнологий является экологическая биотехнология, для которой не только в отдаленном будущем, а уже сегодня находится много возможностей и вариантов законного применения. Поскольку вопросы, касающиеся сохранения окружающей среды, качества получаемой продукции и рационального использования в их производстве ресурсов все еще остаются актуальными.

В этом плане, экологическая биотехнология мало чем отличается от других отраслей биотехнологии, которые используются в зависимости от характера проблем, способов их решения. Основное внимание в биотехнологии уделяется очистке, переработке продуктов жизнедеятельности человека: бытовых отходов, стоков. При грамотном подходе и принятии своевременного решения в разработке различных очистных схем удается не только создать безотходные производства, минимизировав тем

самым негативные воздействия, а даже извлечь выгоду. Но важно помнить, что биотехнологические производства допускающие нарушения технологического режима могут оказаться опасными для обслуживающего персонала и потребителей продукции.

Относительно сельского хозяйства помочь экологической биотехнологии будет состоять в получении достаточных объемов продуктов питания при минимальном применении химических средств: удобрений, гербицидов, стимуляторов роста. Но здесь важная роль отводится, прежде всего, генетической, клеточной инженерии способной создавать высокоурожайные, устойчивые к болезням сорта культурных растений, тем самым предполагая снижение, а со временем исключение химикатов. Используя достижения современной генетики, биотехнологии можно улучшать свойства многих сельскохозяйственных продуктов, тем самым исключить из рациона животных, птицы различные кормовые добавки химического, микробного синтеза: лизин, витамины, кормовые дрожжи, в производстве которых присутствует определенная экологическая опасность.

В этом свете очень важно расширять производство бактериальных удобрений, биологических средств борьбы, биологических консервантов кормов. Повышения плодородия почвы можно достичь применением органических удобрений, компостов, отходов животноводческих ферм предварительно обезвреженных методом метанового брожения. В дальнейшем экологическая биотехнология должна создать полностью безвредные и рациональные процессы переработки продуктов сельского хозяйства, а химического сырья, в безвредные в биологическом отношении формы.

### **1.6. Лекция №6 (2 часа).**

**Тема: «Технологическое оборудование промышленного назначения»**

#### **1.6.1 Вопросы лекции:**

1. Характеристика биореакторов и ферментеров.
2. Режимы культивирования
3. Методы культивирования
4. Классификация по технологическим параметрам. Преимущества и недостатки.

#### **1.6.2 Краткое содержание вопросов:**

##### **1 Характеристика биореакторов и ферментеров.**

Для культивирования различных биотехнологических объектов, в том числе микроорганизмов и культур клеток, в зависимости от поставленной задачи используют различное технологическое оборудование. При лабораторных исследованиях – это качалки, при промышленных производствах – биореакторы и ферментеры.

В лабораторных условиях использование качалок и роллерных установок предотвращает осаждение (седиментацию) клеток и обеспечивает достаточную концентрацию растворенного кислорода. В большинстве случаев скорость вращения составляет 50-120 об/мин – для круговых качалок и 1-20 об/мин для роллерных установок. Несмотря на различия в способе перемешивания отличия в продуктивности и росте клеток незначительные.

Промышленное выращивание клеток осуществляют в биореакторах или ферментерах. Их подразделяют на 2 группы: 1) по конструкции; 2) по принципу перемешивания культуральной жидкости.

В биореакторах, относящихся к первой группе, перемешивание клеток происходит путем аэрирования воздухом. Это барботажный тип биореактора, при котором процесс перемешивания происходит поднимающимися пузырьками воздуха. В таких биореакторах хорошие результаты культивирования получают у большинства культур, однако их использование ограничено так как сложно поддерживать суспензию в гомогенном состоянии при высоких концентрациях.

Второй тип биореакторов это эрлифтные биореакторы в них перемешивание суспензии осуществляется за счет создания градиента плотности. В таких биореакторах создается большие клеточные биомассы.

Вторая группа биореакторов представляет собой аппараты применением механических перемешивающих устройств. Биореакторы этого типа позволяют изучать растительные клеточные популяции в очень широком диапазоне концентрации биомассы клеток. Использование таких биореакторов ограничено в связи с стрессирующим действием на клеточную популяцию.

## **2. Режимы культивирования.**

Выращивание растительных клеточных культур и микроорганизмов в биореакторах можно проводить в режимах периодического и проточного (непрерывного) культивирования.

Периодическое культивирование – это аналог выращивания клеточных культур в колбах на качалке. Периодическую культуру можно рассматривать как замкнутую систему, которая в своем развитии проходит четыре стадии – начальную, экспоненциальную, стационарную и отмирания. Условия существования культуры во всех этих фазах различные.

Проточное (непрерывное) культивирование характеризуется постоянным добавление в биореактор свежей питательной среды и постоянным отбором либо суспензии (открытое проточное культивирование), либо отработанной среды (закрытое проточное культивирование).

Непрерывное культивирование представляет собой открытую систему, стремящуюся к установлению динамического равновесия. Для организмов создаются неизменные условия среды. Проточное культивирование более сложное и подвергается автоматическому регулированию, так как связано с введением в схему биореактора дополнительных устройств (перистальтических насосов, разделительных устройств).

В периодической культуре условия постоянно меняются – плотность культуры возрастает, а концентрация субстрата уменьшается. Часто требуется, чтобы клетки долго находились в фазе экспоненциального роста, при постоянной концентрации субстрата и неизмененных условиях. Этого можно достичь, если в сосуд вводить постоянно новый питательный раствор и одновременно удалять из него соответствующее количество клеточной суспензии.

Применение проточных вод при культивировании тканей обеспечивает динамичность и постоянство условий их питания и имеют преимущества перед непроточными питательными средами. Поскольку этот метод достаточно сложен, то он не нашел широкого применения.

## **3. Методы культивирования.**

В практике микробиологических исследований широко применяют две разновидности открытого проточного культивирования: хемостатический и турбидостатный метод.

Хемостатный метод культивирования базируется на использовании биореактора. В котором с постоянной скоростью подается питательная среда и одновременно с той же скоростью отбирается клеточная суспензия. При этом объем выращиваемой суспензии остается постоянным. Хемостат состоит из сосуда культиватора. В который из специального сосуда поступает питательный раствор. Благодаря аэрации и механическому перемешиванию, в культуре создаются оптимальные условия для снабжения клеток кислородом и более быстрого и равномерного распределения питательных веществ. Рост культуры в хемостате контролируется концентрацией субстратов. На таком ограничении основана стабильность системы.

Турбидостатный метод. При этом методе измерении концентрации клеточной биомассы и её поддержание основано на изменении скорости протока. Работа турбидостата основана на поддержании постоянной плотности суспензии, или постоянной мутности. Датчик мутности управляет поступлением питательного раствора.

#### **4. Классификация по технологическим параметрам. Преимущества и недостатки.**

Преимущества:

- малая стоимость;
- гибкость, т.е. возможность наработке в одном биореакторе разных продуктов;
- возможность менять время культивирования;
- процесс менее подвержен инфицированию, мутациям клеток из-за отсутствия протока и относительно малого времени на ферментацию;
- удобен для получения малого количества продукта;
- условия культивирования можно поддерживать в оптимальный условиях для роста биомассы и для биосинтеза продукта;
- процесс удобен для биосинтеза вторичных метаболитов.

Недостатки:

- необходимость приготовления посевного материала;
- велико непродуктивное время ферментации;
- в связи с частой стерилизацией быстрое изнашивание приборов;
- производство по биомассе и продукту часто ниже, чем при непрерывном процессе.

#### **1.7 Лекция № 7 (2 часа).**

**Тема: «Продукты биотехнологии и блок схемы их производства»**

##### **1.7.1 Вопросы лекции:**

- 1 Характеристик продуктов биотехнологического производства
2. Стадии биотехнологического производства
3. Белковые продукты, аминокислоты, гормоны, витамины.

##### **1.7.2 Краткое содержание вопросов:**

###### **1. Характеристика продуктов биотехнологического производства.**

Продукты, получаемые биотехнологическими способами, отличаются не только по цвету, вкусу, запаху или химическому составу, но и по тому, какое место в типовой технологической схеме они занимают.

Продуктами биотехнологического производства могут быть:

1. Газы — со стадии ферментации (диоксид углерод! при спиртовом производстве, биогаз — при переработке ходов путем метанового брожения, водород — при культивировании фототрофов).

2. Среда ферментации — культуральная жидкость вместе с микроорганизмами (например, кефир, йогурт)1 твердый субстрат (например, сыр или ферментирован» заквасками колбаса).

3. Жидкость (осветленная, надосадочная, нативный раствор, фильтрат, угат, пермеат или супернатант), получен после отделения биомассы, или ее концентрат. Готовые продукты на этой основе — пиво, вино, квас. Концентрат культуральной жидкости обычно получают выпариванием или высушиванием (например, кормовой лизин или кормовые антибиотики).

4. Биомасса инактивированная (например, кормой дрожжи, которые на завершающих стадиях подвергают тепловой стерилизации).

5. Биопрепарат — жизнеспособная биомасса микроорганизмов в жидким или высушенном виде (пекарские дрожжи, бактериальные средства защиты растений, деструкторы нефтяных загрязнений, бактериальные удобрения, силосные закваски и т. п.).

6. Ослабленная биомасса микроорганизмов (например, живые вакцины, полученные при обработке клеток патогенных микроорганизмов тепловыми воздействиями или химическими реагентами для снижения их патогенности)

7. Внеклеточные и внутриклеточные биопродукты. Чрезвычайно разнообразны по своей структуре, могут быть легкокипящей жидкостью (например, этанол, выделяемый из среды отгонкой или ректификацией) или твердым веществом (многие медицинские антибиотики, чистые пищевые или медицинские аминокислоты, лимонная кислота).

8. Переработанная биомасса микроорганизмов — гидролизаты и ферментолизаты, используемые как источники кормления для животных или как вкусовые добавки; клеточные оболочки, получаемые после разрушения микроорганизмов и применяемые как сорбент для очистки соков, вина, пищевых жидкостей.

9. Очищенная от загрязнений жидкость (например, при очистке сточных вод) или твердая среда (например, почва при микробиологической очистке ее от нефтяных загрязнений).

10. Жидкая среда (культуральная жидкость) с экстрагированными (выщелоченными) из твердой фазы компонентами (например, бактериальное выщелачивание металлов из руд, микробиологическое обессеривание угля и нефти). Все эти продукты получают по технологическим схемам или блок-схемам, содержащим несколько стадий. В каждом конкретном случае это определяется целевой задачей и также свойствами микроорганизмов, сырья и самого готового продукта.

## **2. Стадии биотехнологического производства.**

Блок-схема — это последовательность технологических стадий биотехнологического производства, необходимых для получения продукта. Рассмотрим несколько примеров блок-схем производства различных продуктов.

Блок-схема производства биогаза значительно короче общей типовой схемы и включает подготовительные стадии, стадию метанового брожения и сушку как стадия концентрирования. Компримирование (сжатие) биогаза можно рассматривать как создание его готовой формы.

В производстве йогурта предусмотрена подготовительные стадии, одна биотехнологическая и стадия розлива, представляющая собой приведение продукта готовой форме.

Процесс производства хлеба состоит из следующих этапов.. Приготовление опары (сuspензии муки в воде) аналогично приготовлению среды в биотехнологических производствах. В опару добавляют дрожжи для брожения затем вновь муку (замес теста) и проводят анаэробный биологический процесс брожения. Далее тесто делят на заготовки, и они уже в третий раз подвергаются воздействию дрожжей в процессе расстойки. При этом диоксид углерода, образующийся при брожении, увеличивает объем хлеба и создает его пористость. Стадия выпечки закрепляет полученный результат и превращает, по существу, жидкий полуфабрикат в твердое тело — хлеб и хлебобулочные изделия.

Приведенные примеры показывают, что биотехнологические производства включают в себя как специфические для биотехнологии стадии (ферментация, биоокисление, биотрансформация, формация, брожение, бактериальное выщелачивание, биокомпостирование, ферментолиз, стерилизация среды и воздуха, дезинтеграция микроорганизмов), так и множество стадий, встречающихся в химической технологии (фильтрация, сепарация, отстаивание, экстракция, сушка, выпаривание, ультрафильтрация и обратный осмос, кристаллизация, ректификация, коагуляция и др.). Эти стадии, конечно, имеют свою специфику в биотехнологических производствах в связи с физическими и

физико-химическими свойствами биологического объекта, его лабильностью и вариабельностью.

### **3 . Белковые продукты, аминокислоты, гормоны, витамины.**

Одним из современных способов получения белковых веществ является микробиологический синтез, поскольку по скорости роста

Биотехнологические методы применяют для получения разнообразных соединений, имеющих коммерческую ценность и являющихся продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, а также клеточных культур растений и животных. В первую очередь это соединения первичного метаболизма, широко используемые в народном хозяйстве (белки, аминокислоты, витамины и другие соединения). Остановимся на некоторых из них на некоторых из них.

Самыми важными веществами всех живых организмов являются белки — азотсодержащие вещества, различные по своему строению и молекулярной массе. В составе белков содержится примерно 16 % азота, а также углерод, водорода, кислород и часто другие элементы, такие как сера, фосфор, железо, (молекула гемоглобина, например, содержит четыре атома железа) и медь.

Структурообразующие белки тела животных и человека называют фибриллярными или волокнистыми белками. Они имеют вытянутую нитеобразную форму. Важнейшие фибриллярные белки — это кератин (входит в состав волос, ногтей, мышц, рогов, игл и перьев животных) и коллаген (структурный компонент сухожилий, кожи, костей, соединительной ткани). При кипячении коллаген гидролизуется и образует растворимый в воде белок — желатин.

Белок животного происхождения — наиболее дефицитный компонент пищи. Мировая потребность в нем в настоящее время удовлетворяется лишь на 40 %. В связи с этим необходим поиск (в том числе и методами промышленной биотехнологии) ресурсов белка для пищевых целей. Одним из современных способов получения белковых веществ является микробиологический синтез, поскольку по скорости роста микроорганизмы превосходят сельскохозяйственные культуры в сотни, а животных — в тысячи раз. Кроме того, для микробиологического синтеза не требуется больших земельных площадей, он не зависит от погодных и климатических условий и не загрязняет окружающую среду ядохимикатами.

Микробные белки близки по составу к белкам животного происхождения, и их применение в кормопроизводстве улучшает качество и усвоемость традиционных растительных кормов. Например, 1 т кормовых дрожжей обеспечивает экономию 5 т зерна и увеличивает продуктивность в животноводстве на 15-30 %. Современный средний завод производству микробного белка мощностью 50 т/год, занимающий площадь 0,2 га, может обеспечить потребность в белке до 10 млн человек. Сельскохозяйственные технологии для таких масштабов производства требуют либо наличия до 16 тыс. га земельных угодий, засеянных пшеницей либо содержания фермы, производящей 400 поросят в день.

В 1960-е гг. появился термин «белок одноклеточных организмов» (обычно употребляют его сокращенное название аббревиатуру БОО, от single cell protein — SCP), который обозначают целые неживые высушенные клетки водорослей, дрожжей, бактерий или грибов, используемого в качестве белкового продукта для кормовых и пищевых целей. В отечественной литературе этот белок называется белково-витаминным концентратом или БОО.

Все эти названия несколько условны, так как в биомассах, помимо белковой, существенную долю занимают другие компоненты — сахара, липиды, нуклеиновые кислоты.

Белок одноклеточных организмов должен удовлетворять ряду специальных требований, главные из которых — питательность, перевариваемость, экономическая эффективность. Питательность этого белка, определяемая по химическому составу, близка питательности традиционных белковых продуктов.

Важнейшим условием при разработке новых технологий получения белка одноклеточных является доступность сырья. Это предполагает наличие различных резервных вариантов, позволяющих оперативно заменять и использовать различные источники сырья без существенного изменения качества получаемого продукта. В современных промышленных процессах используют как «чистое» сырье постоянного химического состава, так и комплексные соединения, включая отходы различных производств. Последнее наиболее выгодно экономически и имеет огромное значение для охраны окружающей среды.

Для синтеза белка микроорганизмы способны использовать различные углеродсодержащие субстраты: - углеводы; - жидкие углеводороды; - газообразные углеводороды; - оксидаты углеводородов; - углекислый газ, включая смеси с водородом.

Независимо от вида используемого сырья, типовая схема микробиологического производства белка включает получение и подготовку сырья, получение посевного материала, ферментацию, выделение, инактивацию, сгущение микробной биомассы, последующее высушивание и стандартизацию готового продукта.

Максимальные скорости синтеза белковых веществ микробными клетками реализуются при оптимальных условиях среды, когда удельная скорость роста близка к оптимальной. Поэтому для получения белка одноклеточных биотехнологические процессы реализуют в проточном режиме который позволяет стабилизировать практически все параметры стадии ферментации на уровнях, оптимальных для размножения клеток со скоростями роста, близкими к максимальной, т. е. в режиме белковой направленности биосинтеза.

Микробная биомасса питательна, если ее компоненты перевариваются ферментами пищеварительного тракта высших животных или человека. Препятствием этому могут быть клеточные стенки отдельных продуцентов, которые предварительно приходится разрушать, а также высокий уровень нуклеиновых кислот. Последние не опасны для высших животных, поскольку они метаболизируются в их организме и выводятся с уриной. Для человека же такой уровень нуклеиновых кислот неприемлем, так как в ходе их усвоения возможно нарушение обмена веществ и возникновение патологических состояний. Поэтому для пищевых целей микробную биомассу предварительно обрабатывают, используя различные методы разрушения и денуклеотизации.

Технология получения микробного белка является в настоящее время самой крупнотоннажной отраслью биотехнологии, производящей важнейшие кормовые препараты белковые добавки для животноводства, звероводства, птицеводства, рыбоводства, а также белок пищевого назначения с использованием разнообразного сырья и субстратом

Микроорганизмы, используемые в пищевой промышленности, часто входят в состав конечного продукта (хотя доля их там обычно невелика). Особенность белка одноклеточных организмов заключается в том, что он практически целиком состоит из микробной биомассы и в его производстве нередко принимают участие микробы, которые ранее в пище отсутствовали. По этой причине к белку одноклеточных организмов предъявляются повышенные требования (в том числе требование биобезопасности) учреждениями, контролирующими качество пищевых продуктов. Поэтому производство БОО направлено преимущественно на выработку кормов для животных, а не белков, непосредственно идущих в пищу. Корма для животных должны содержать некоторое количество белка (до 15-20 % — в зависимости от их вида и способа содержания). Для их производства можно использовать более широкий круг субстратов, в том числе и органические вещества отходов, что экономически выгодно.

К БОО-продуктам, производимым промышленностью на корм животным, относятся прутин (Pruteen) фирмы ICI (биомасса бактерий, выращенных на метаноле), топрина (Тирпра) фирмы BP (дрожжи, выращенные на алканах) и грибная масса,

получаемая по технологии фирмы Finnish Pekilo. При ее производстве в качестве субстрата используют сульфитный щелок — отход бумажной промышленности. Все эти БОО представляют собой слабоокрашенные порошки.

Число БОО-продуктов, используемых в пище, немногочисленно. Это дрожжевой экстракт (гидролизат пекарских дрожжей), применяемый в небольшом количестве как вкусовая и витаминная приправа.

## 1. 8 Лекция №8 (2 часа).

**Тема: «Представление о нанобиотехнологиях»**

### 1.8.1 Вопросы лекции:

1. Представление о нанотехнологиях.
2. Нанотехнологии в сельском хозяйстве
3. Основные направления развития нанобиотехнологий.

### 1.8.2 Краткое содержание вопросов

#### 1. Представление о нанотехнологиях.

В настоящее время происходит формирование и развитие нового научного направления — нанобиотехнологии, что вызвано переходом от изучения макрообъектов к изучению частиц размером 1-10 нм. «Нано» (от греч. παπος - карлик) означает одну миллиардную долю какой-либо единицы измерения.

На многих объектах показано, что столь значительное уменьшение размеров частиц приводит к качественным изменениям их физико-химических свойств и получаемых на их основе систем. В них возрастает доля поверхностных атомов и молекул, что и влияет на свойства (электрических, магнитные, механические) такой частицы в целом. Иногда наноматериалы могут приобретать совершенно новые качества.

Все это может означать, что наноразмерные объекты имеют такие свойства и особенности строения, которые выделяют их как независимую часть Природы, промежуточную между микро- и макромиром. Поэтому нанотехнология как научное направление носит междисциплинарный характер и в одинаковой степени зависит от достижений физики, химии и биологии.

Наномир подразумевает мир объектов или связанных структур имеющих характерные размеры от долей нанометра до сотен нанометров. Размеры нанообъектов — миллиардные доли метра. Например, размер атомов по порядку величины равен 0,1 нм; длины валентных связей и расстояния между атомами в кристаллических решетках — того же порядка; диаметр двусpirальной молекулы ДНК — 2 нм; толщина клеточной мембранны — 6-10 нм; размеры вирусов - от 20 до 300 нм; характерные размеры молекул белков - от 10 до 100 нм. Минимальный размер углеродных нанотрубок, синтезированных в настоящее время, составляет 0,4 нм. Нижняя граница объектов, которыми занимается нанотехнология, определяется радиусом атома порядка 0,1 нм, верхняя — размерами до 0,1 мкм (100 нм), т. е. размерами биомолекул, при которых утрачивается специфика свойств поведения наночастиц.

Таким образом, нанотехнологии — это совокупность научных знаний, способов и средств, направленных на регулируемую сборку (синтез) из отдельных атомов и молекул разных веществ, материалов с линейным размером структурных элементов до 1 нм (миллиардная доля метра). Кроме того, нанотехнологии — это и методы управления наночастицами, в результате применения которых создаются новые способы обработки, изготовления, изменения состояния, свойств, формы сырья, материала или полуфабриката.

История использования нанотехнологии уходит корнями в глубокую древность: египтяне смешивали сажу с водой для изготовления так называемых китайских чернил, а скифы применяли магнитную жидкость Fe3O4 в виде красок. Опалесцирующие красные и

рубиново-красные стекла Древнего Египта, Древнего Рима (кубок Ликурга) и витражей Средневековья (мастера Клауса Кункеля) можно также считать исторически первыми наноматериалами.

Первые упоминания о методах построения любых материальных объектов «атом за атомом», которые впоследствии стали основой нанотехнологии, прозвучали в 1959 г. в докладе на тему «Там, внизу, еще много места», сделанном американским физиком-теоретиком, лауреатом Нобелевской премии Р. Ф. Фейнманом на ежегодном собрании «Американского физического общества. Он говорил о том, что существует «поразительно сложный мир малых форм когда-нибудь (например, в 2000 г.) люди будут удивляться тому, что до 1960 г. никто не относился серьезно к исследованиям итога мира». Но только в последние несколько лет предположения Фейнмана приблизились к реальности.

Научные исследования в области нанотехнологии признаны приоритетными во всем мире. Основные усилия ученых сконцентрированы на уменьшении размеров вычислительных устройств, создании механических устройств субмикронных размеров (электрических двигателей, трансмиссий и т. п.) и синтезеnanoструктур химическими методами.

## **2. Нанотехнологии в сельском хозяйстве.**

Использование нанотехнологий в сельском хозяйстве связано с обеззараживанием воздуха и различных материалов, в том числе кормов и конечной продукции животноводства, а также с обработкой семян и урожая в целях его сохранения. Как и в медицине, оправдали надежды ученых наноэмulsionии и антибактериальные нанопрепараты, действие которых значительно пролонгируется за счет наночастиц серебра. Такие материалы используют, например, в доильных аппаратах; кроме того, они решают проблему загрязнения фильтров любых кондиционеров.

Нанотехнологии применяют при стимуляции роста растений, лечении животных, для улучшения качества кормов. Есть опыт внедрения нанотехнологий с целью уменьшения энергоемкости производства, оптимизации методом обработки сырья и увеличения выхода конечной продукции; создания новых упаковочных материалов, обеспечивающих долгую сохранность конечной продукции.

Большинство подобных технологий связано с пищевой промышленностью, с использованием наноматериалов для упаковки пищи или определения и — в отдельных случаях - нейтрализации опасных токсинов, аллергенов или патогенов. Развиваются проекты по созданию и улучшению пищевых добавок, получению растительного масла с нанодобавками, которые препятствуют поступлению холестерина в кровь млекопитающих.

Отдельные проекты направлены на развитие более эффективных и средосберегающих агротехнологий (например, использование наноматериалов для очистки вод в агроэкосистемах или для переработки отходов растениеводства в этанол). В животноводстве разрабатывают методы использования нанодобавок в целях уменьшения доз ростовых факторов и гормонов, нейтрализации патогенов на ранних стадиях их контакта с животными.

По мнению ряда ученых, нанотехнологии существенно упрощают и ускоряют решение традиционных проблем генетики сельскохозяйственных видов, таких, как контроль происхождения, выявление носителей неблагоприятных мутаций или инфекций, а также генов, связанных с хозяйственно ценными признаками, включая устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Получены и успешно испытаны на животных эмульсии, содержащие нанокапли, которые обладают антивирусной и антимикробной активностью. Они способны обеззараживать поверхности, уничтожая не только сами микроорганизмы, но и споры, при этом оставаясь безвредными для животных клеток. Потенциально подобные эмульсии

могут найти применение не только в медицине, но и в пищевой промышленности, для очистки воды и даже для защиты от бактериологического оружия.

Особое место занимает создание устройств с использованием биологических макромолекул для изучения биологических систем либо управления ими, так как хорошо известна способность биомолекул к самосборке в наноструктуры. Например, липиды способны спонтанно объединяться и формировать жидкие кристаллы. ДНК используется не только для создания наноструктур, но и в качестве важного компонента наномеханизмов. Предполагается, например, что, вместо того чтобы создавать кремниевую основу микросхем, нанотехнологии смогут применять двухцепочечную молекулу ДНК, особенности которой позволяют объединять атомы в предсказуемой последовательности. Вполне вероятно, что ДНК станет основным компонентом компьютеров следующего поколения.

Благодаря микро- и нанотехнологиям многократно попытается возможность обнаружения и анализа сверхмалых количеств различных веществ. Одним из вариантов такого рода устройств является «лаборатория на чипе». Она представляет собой пластинку, на поверхности которой упорядоченно размещены рецепторы к нужным веществам, на пример антитела. Такое устройство способно обнаруживать буквально отдельные молекулы и может быть использовано при определении последовательности оснований ДНК или аминокислот для целей идентификации, выявления генетических или онкологических заболеваний, обнаружения инфекционных возбудителей, а также токсических веществ.

Биологические наночипы помогут проводить диагностику соматических и инфекционных заболеваний, в том числе видовую идентификацию возбудителей особо опасных инфекций и токсинов.

Устройства, предназначенные для манипуляций с НАНОобъектами (наночастицами, молекулами и отдельными атомами), можно назвать наноманипуляторами. Таковыми являются сканирующие зондовые микроскопы, которые позволяют перемещать любые объекты, вплоть до атомов, созданы прототипы нескольких вариантов «нанопинцетов».

Уже нашли применение такие достижения нанотехнологий, как:

- амфи菲尔ные белки, поддерживающие рост клеток для восстановления поврежденного спинного мозга;
- покрытия на опухоли головного мозга из магнитных наночастиц и чувствительных к ферментам частиц;
- зонды из наночастиц для внутриклеточной доставки препарата и экспрессии генов и квантовые точки, которые обнаруживают и определяют количество биомаркеров рака молочной железы человека.

Согласно NanoBiotech News, с 2005 г. в доклинической, клинической или коммерческой разработке находятся 130 нанотехнологичных лекарств и систем доставки и 125 устройств и диагностических тестов. Все это еще раз подтверждает: будущее медицины во многом зависит от нанотехнологий.

Несмотря на риски и проблемы, связанные с нанотехнологиями, предполагается, что наноустройства смогут полностью заменить существующие промышленные и сельскохозяйственные технологии, во много раз превзойти их по производительности при одновременном снижении затрат. Ученые прогнозируют возможность встраивания в клетки крови датчиков, реагирующих на появление радионуклидов в окружающей среде и раковых клеток в организме, а также создание сверхчувствительных сенсоров и «умной» косметики, новых видов топлива и материалов для полетов в космос.

### **3. Основные направления развития нанобиотехнологии**

Рассмотрим, как в будущем можно осуществлять диагностику и лечение наклеточном, субклеточном и молекулярном уровнях.

Подход «сверху вниз». Заключается этот подход в дальнейшем усовершенствовании и миниатюризации существующих микроустройств. Ряд ученых во всем мире занимаются созданием таких устройств, которые могли бы работать внутри человеческого организма. Они должны быть оснащены бортовыми системами управления, связи и ориентации, основанными на нанотехнологии. Наносенсоры и наноманипуляторы могут стать реальностью уже в обозримом будущем.

«Мокрая нанотехнология». Данный подход основан на применении готовых механизмов, существующих в живой природе. В 1967 г. Айзек Азимов первым предложил использовать механизмы, состоящие из молекул нуклеиновых кислот. Позднее В. Вайт предложил использовать генетически модифицированные вирусы для «ремонта» клеток. В настоящее время их уже активно применяют для внесения в клетки нового генетического материала. В перспективе можно представить себе появление разнообразных «роботов»-вирусом, способных распознавать клетку специфического типа, находящуюся в определенном состоянии. В зависимости от конкретной ситуации, такой «робот»-вirus сможет или убить эту клетку (например, возбудителя заболевания), или внести в нее необходимые молекулы ДНК или РНК, вплоть до полной замены поврежденного генетического материала.

Наномеханизмы. Этот подход представляется наиболее фантастическим, но и наиболее перспективным. Основное внимание уделяется конструкциям из атомов углерода, что обусловлено его способностью образовывать огромное количество разнообразных соединений, а также рекордной прочностью связи между двумя атомами углерода. Примерами углеродных молекул, которые могут послужить прототипами нанотехнологических компонентов, являются фуллерны-шары и нанотрубки из пяти- или шестиугольных колец атомов углерода. Из углерода возможно изготовить молекулы, имеющие форму самых разнообразных деталей — шестеренок, штоков, подшипников и т. д. Устройство для такой сборки наномеханизмов называется ассемблером.

Нанороботы. Создание нанороботов — основная задача будущего, хотя пока это всего лишь гипотетическое направление. Предполагается, что нанороботы будут представлять собой устройства молекулярных размеров, изготовленные из искусственно синтезируемых углеродных цепочек или на основе биологических макромолекул, снабженные детекторами, манипуляторами и встроенным компьютером и способные к перемещению в окружающей среде. Принцип их работы будет напоминать механизмы действия белковых молекул. Нанороботы будут оказывать помощь в решении огромнее количества задач — в диагностике и лечении любых болезней, включая старение, устранении дефектов в организме больного человека путем управляемых нанохирургических вмешательств, перестройке организма «по заказу», а также в изготовлении сверхпрочных конструкций и т. д.

## **1. 9 Лекция №9 (2 часа).**

**Тема: «Международная и Российская законодательная база по биобезопасности»**

### **1. 9.1 Вопросы лекции:**

1. Необходимость принятия международных документов регламентирующих биотехнологические производства.
2. Международная законодательная база по биобезопасности и ее реализация.
3. Документы, регламентирующие генно-инженерную деятельность в Российской Федерации.
4. Документы, регламентирующие использование ГМ-продуктов, их идентификация и безопасность Российской Федерации

## **1.9.2 Краткое содержание вопросов**

### **1. Необходимость принятия международных документов регламентирующих биотехнологические производства.**

В начале XX в. А. Пуанкаре писал, что в области научных исследований «любое правовое вмешательство будет неуместно и несколько нелепо». Однако последующие события доказали, что самые «нелепые» проекты способны стать реальностью. Поэтому сегодня стоит вопрос о создании свода законов, определяющих безопасность и этику научных исследований.

Во всех государствах в настоящее время приняты законы и другие государственные акты, создающие нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии. В большинстве своем они адаптированы к международным требованиям и правилам, зафиксированным в документах ООН, ВОЗ, ЮНЕСКО и других международных организаций.

Приняты такие международные документы, как Всеобщая декларация по геному человека и правам человека, международная Конвенция о биологическом разнообразии, Конвенция по правам человека и биомедицине, Конвенция по защите прав и достоинства человека в связи с использованием достижений биологии и медицины.

Сегодня одним из важнейших является вопрос о генетически модифицированных организмах (ГМО) и использовании продуктов, полученных из них. Эксперты считают, что в связи с их бесконтрольным распространением мировое сообщество может вскоре столкнуться с совершенно новым видом терроризма. Призывы к жесткому контролю ГМ-продуктов звучат все чаще.

Различные требования, предъявляемые в разных странах к ГМ-продуктам, и колоссальная разница между посевными площадями, занимаемыми генетически модифицированными растениями в различных регионах (рис. 10 1) свидетельствуют о том, что проблема очень далека от окончательного решения. Мировая динамика роста площадей возделывания трансгенных культур поражает своим размахом: с 1996 по 2003 г. они выросли в 40 раз (с 1,7 до 67,7 млн гектаров). Лидерами являются США, Аргентина, Канада. Мировые продажи трансгенных растений (в основном сои, хлопка, кукурузы, рапса) увеличились с 75 млн долларов 1995 г. до примерно 8 млрд долларов в 2005 г.

В 2004 г. в Аргентине было произведено 34,5 млн тонн генетически модифицированной сои, т. е. 49,5 % всех выращенных здесь зерновых, а под ее посевами было занято 14 млн га, т. е. 54 % всех посевых площадей страны. Таким образом, генетически модифицированная соя стала основной сельскохозяйственной культурой Аргентины. При этом если в США только 40 % выращиваемой сои является трансгенной, то в Аргентине этот показатель равен 99 %. По данным российского Федерального реестра пищевой продукции, на 26 февраля 2001 г. в нашей стране был зарегистрирован и допущен к использованию на внутреннем рынке 81 вид трансгенного пищевого сырья. Практически все из них являются производными сои. В 2004 г. службами Госсанэпиднадзора Российской Федерации были обнаружены трансгенные соевые добавки в 17,7 % исследованных мясных продуктов и в 16,7 % хлебобулочных и крупяных изделий хлынувший в Россию поток продуктов, содержащих трансгенные компоненты, в условиях неоднозначности результатов исследований в области их медицинской и экологической безопасности ставит ряд задач. Во-первых, необходимы анализ и оценка мотивов разработки, производства и использования генетически модифицированных продуктом питания. Во-вторых, не проработана российская правовая база, регламентирующая использование таких продуктов.

## **2. Международная законодательная база по биобезопасности и ее реализация.**

Международное сообщество приняло ряд документов, определяющих правила безопасности при работе с генетически измененными организмами. Это Картагенский протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии (регулирует

перемещение ГМО), Декларация Рио (определяет, что доказательства безвредности ГМ-продуктов лежат на производителе продукции), документы Кодекса Алиментариус и Комиссии ООН по пищевым стандартам (определяют стандарты для ГМ-продуктов), а также Директивы Европейского Парламента и Совета (определяют методы оценки угрозы, правила мониторинга, а также условия, при которых выдаются разрешения на выпуск ГМО). Разработка и принятие этих документов сопровождаются ожесточенной борьбой между производителями ГМ-продуктов и экологами.

Международная Конвенция о биологическом разнообразии, подписанная 13 июня 1992 г. в Рио-де-Жанейро, указывает на недопустимость как запрещения, так и полного отказа от регулирования производства и использования генетически модифицированных организмов. В Конвенции (ст. 19, п. 3) отмечается необходимость применения мер предосторожности при использовании живых измененных организмов, однако сами меры не конкретизируются. Таким образом, в этом международном документе предусмотрена, хотя и в «свернутой» форме, правовая защита двух сторон — как производителей, так и потребителей ГМ-продуктов.

Различные страны при этом по-разному воплощают в свое законодательство положения о мерах предосторожности и формах контроля за ГМ-продуктами. В США, например, нет особых законов, определяющих критерии безопасности трансгенных продуктов. Для всех продуктов питания они являются общими («Закон о пищевых продуктах и косметических препаратах»).

Одним из наиболее жестких законодательств в области ГМ-продуктов является законодательство Евросоюза. Так, Директива Европейского Парламента и Совета от 23.04.1990 № 220/90 по выпуску в природу генетически модифицированных организмов (ГМО) требует разрешения Государственного секретаря ЕС по вопросам окружающей среды, транспорта и регионов на любое высвобождение в окружающую среду ГМО — от одного растения в горшке до крупномасштабного промышленного производства. Процедура обращения за разрешением включает в себя:

- оценку возможного риска окружающей среды;
- описание природы измененного организма;
- описание происхождения и типов переносимых генных последовательностей;
- описание методики переноса.

То есть этим документом предусмотрена защита двух групп интересов — как производителей, так и потребителей (оценка экологического риска).

Директива Европейского Парламента и Совета от 27.01.1997 № 258/97 дополняется подробной регламентацией оценки медико-биологической безопасности ГМО (модели потребления, исследование пищевой ценности, аллергические и токсикологические исследования, способность изменять микробиоценоз кишечника человека) и критериев их технологической оценки (параметры производства, оценка физических, химических и органолептических свойств).

Исследовательская группа Кодекс Алиментариус, первое заседание которой прошло в 2000 г., отметила необходимость дополнительной оценки медико-биологической безопасности ГМ-продуктов с учетом метаболических особенностей различных потребительских групп (дети, беременные, кормящие матери, пожилые люди, пациенты, страдающие сахарным диабетом), а также необходимость долговременных «хронических исследований».

Директива Европейского Парламента и Совета от 12.03.2001 № 18/2001 расширила критерии оценки экологической безопасности ГМ-растений прежде всего для защиты потребителей, включив в число критериев оценку влияния на естественных обитателей сельскохозяйственных земель; оценку возможных воздействий на фермеров и рабочих, занятых в сельском хозяйстве; оценку влияния на биогеохимические процессы и др.

Наконец, Директива Европейского Парламента и Совет от 22.09.2003 № 1829/2003 о генетически модифицированных продуктах и кормах ввела с апреля 2004 г. новые

правила маркировки ГМ-продуктов в странах Евросоюза. Маркировке подлежит вся пищевая продукция, полученная с использованием ГМ-продуктов при их содержании более 0,9 %.

Всемирная торговая организация (ВТО) 7 февраля 2006 г. заявила, что Евросоюз, в нарушение торговых норм, наложил мораторий на использование ГМ-растений и ГМ-продуктов. ВТО также постановила, что шесть отдельных стран, среди которых Франция и Австрия, нарушили правила, введя свои собственные запреты на торговлю и импорт ГМ-продуктов. Жалобу в ВТО на Евросоюз подали США, Канада и Аргентина.

### **3. В Российской Федерации действует около полутора десятков документов, имеющих отношение к ГМ-продуктам.**

После принятия международной Конвенции о биологическом разнообразии, ратифицированной РФ в 1995 г. (Федеральный закон от 17.02.1995 № 16-ФЗ «О ратификации Конвенции о биологическом разнообразии»), в России принимаются Федеральные законы от 05.07.1996 № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» и от 12.07.2000 № 96-ФЗ «О внесении изменений и дополнений в Федеральный закон "О Государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности"». Статья 5 этого закона гласит: «Основными направлениями государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности в России являются:

улучшение условий жизни человека и охрана здоровья; охрана и восстановление окружающей среды, сохранение биологического разнообразия;

повышение эффективности сельского хозяйства» и др. При этом указывается: «Генно-инженерная деятельность должна основываться на следующих принципах:

безопасности граждан (физических лиц) и окружающей среды;

общедоступности сведений о безопасности генно-инженерной деятельности;

сертификации продукции, содержащей результаты генно-инженерной деятельности, с указанием полной информации о методах получения и свойствах данного продукта».

Таким образом, законы регулируют отношения в сфере природопользования, охраны окружающей среды и обеспечения экологической безопасности, возникающей при осуществлении генно-инженерной деятельности с биологическими объектами, за исключением человека, его клеток и тканей, что регулируется специальным законодательством.

По этим законам государство обязано устанавливать основные направления деятельности федеральных органов государственной власти, органов государственной власти субъектов Российской Федерации, органов местного самоуправления, юридических лиц и граждан (физических лиц) в области генно-инженерной деятельности; устанавливать основные положения правового регулирования отношений, возникающих в области генно-инженерной деятельности; определять механизмы, обеспечивающие безопасность граждан и окружающей среды в процессе осуществления генно-инженерной деятельности и использования ее результатов; устанавливать правовые основы международного сотрудничества Российской Федерации в области генно-инженерной деятельности; создавать условия для развития приоритетных направлений в этой области.

Для реализации указанных задач закон предусматривает принятие федеральных и региональных программ в области развития генно-инженерной деятельности.

В этой связи Правительство РФ принимает Постановление от 22.04.1997 № 464 «О межведомственной комиссии

по проблемам генно-инженерной деятельности». Комиссия разработала Временные правила безопасного получения, использования и передачи генетически модифицированных (трансгенных) растений и их фрагментов, содержащих ре-

комбинантную ДНК. Полный цикл предполагает испытание биологической безопасности, экологическую экспертизу, широкомасштабный выпуск. Постановлением Правительства РФ от 16.02.2001 № 120 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов» утверждено Положение о государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов. Установлено, что генно-инженерно-модифицированные организмы, предназначенные для первого на территории Российской Федерации выпуска в окружающую среду, промышленного использования или импорта, подлежат обязательной государственной регистрации. Регистрация таких организмов и ведение сводного государственного реестра зарегистрированных генно-инженерно-модифицированных организмов возложены на Министерство промышленности, науки и технологий РФ.

Биобезопасность, применительно к указанному Положению, означает отсутствие фактического или прогнозируемого нежелательного воздействия модифицированного организма (в сравнении с исходными модифицированными организмами) на окружающую среду.

Положением утвержден также срок действия свидетельства о государственной регистрации модифицированного организма — до пяти лет с момента включения его в реестр. Срок действия свидетельства может быть продлен — по заявлению его владельца — на следующие пять лет. При появлении в период действия свидетельства о государственной регистрации модифицированного организма новых научно обоснованных данных о биобезопасности модифицированного организма (в сравнении с исходным немодифицированным организмом) Министерство промышленности, науки и технологий РФ может — по представлению экспертного совета — принять решение о его перерегистрации без проведения экспертизы. В случае выявления негативного воздействия модифицированного организма на окружающую среду, подтвержденного экспертизой, проведенной в соответствии с указанным выше Положением, по инициативе федеральных органов исполнительной власти, органов местного самоуправления, заинтересованных организаций и граждан государственная регистрация модифицированного организма может быть аннулирована.

#### **4. Документы, регламентирующие использование ГМ-продуктов, их идентификация и безопасность.**

В соответствии с законодательством РФ (Федеральные законы от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» и от 02.01.2000 № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов») пищевая продукция из ГМО относится к категории «новой пищи» и подлежит обязательной оценке на безопасность и последующему мониторингу за ее оборотом.

В 1999 г. принято постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 26.09.1999 № 12 «О совершенствовании системы контроля за реализацией сельскохозяйственной продукции и медицинских препаратов, полученных на основе генетически модифицированных источников». Этим постановлением запрещено с 1 июля 2000 г. реализовать населению пищевую продукцию и медицинские препараты, полученные из ГМО, без соответствующей маркировки. Указанное постановление рассматривается как подзаконный акт Федеральных законов «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» и «О защите прав потребителей», но федеральный закон, регулирующий производство и использование ГМИП, до настоящего времени не принят.

В 2000 г. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 08.11.2000 № 14 введены Положение о порядке проведения санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников, а также Методические указания «Медико-биологическая оценка пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников». В соответствии с этими документами экспертиза осуществляется по трем направлениям:

медицинско-генетическая оценка (Центр «Биоинженерия» РАН), медицинско-биологическая оценка (ГУ НИИ питания РАМН) и оценка технологических параметров продукта (МГУ прикладной биотехнологии Минобразования России). Результаты проведенной экспертизы представляются в Минздрав России, который выдает разрешение на использование ГМИ в пищевой промышленности и реализацию населению или мотивированный отказ.

В соответствии с Постановлением Правительства РФ от 16.02.2001 № 120 «О государственной регистрации генетико-инженерно-модифицированных организмов» Министерство промышленности, науки и технологий РФ своим приказом от 10.07.2001 № 264 создало Экспертный совет Минпромнауки России по вопросам биобезопасности и утвердило Положение о нем. Совет является постоянно действующим органом, обеспечивающим объективность и надлежащий уровень проверки предоставляемых заявителями сведений о биобезопасности генетико-инженерно-модифицированных организмов.

Значительным шагом вперед в области оценки биобезопасности ГМО и полученных из них продуктов в России стало создание в 2002 г. совместным решением РАН и Госстандарта РФ Технического комитета «Биологическая безопасность пищевых продуктов, кормов и товаров народного потребления и методы ее контроля» Госстандарта России (Приказ Госстандарта России от 01.08.2002 № 175) на базе Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Указанным Техническим комитетом была инициирована и успешно осуществлена разработка (силами ученых Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН и Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) принципиально нового метода идентификации ГМИ в сырье и продуктах питания для оценки их биобезопасности. Метод основан на новейшей технологии микрочипов. На основе этого метода был разработан ГОСТ Р 52174- 2003 «Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа», который в 2003 г. принят Госстандартом России в качестве национального стандарта.

В дополнение к этому постановлению Главного государственного санитарного врача РФ от 16.09.2003 № 149 введена санитарно-эпидемиологическая, микробиологическая и молекулярно-генетическая экспертиза генетически модифицированных микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов. Разработаны и утверждены соответствующие методические указания.

Полный цикл всех необходимых исследований в настоящее время прошли 14 видов продовольственного сырья, продукты переработки которого разрешены для использования в пищевой промышленности и реализации населению без ограничений:

3 линии сои, устойчивые к пестицидам (40-3-2, устойчивая к глифосату; А 2704-12 и А5547-127, устойчивые к глюфосинату аммония);

3 линии кукурузы, устойчивые к пестицидам (GA 21 и NK 603, устойчивые к глифосату, и T-25, устойчивая к глюфосинату аммония);

3 линии кукурузы, устойчивые к вредителям (MON 810 и Bt-1, устойчивые к стеблевому мотыльку, и MON 863, устойчивая к жуку диабротика);

3 сорта картофеля, устойчивые к колорадскому жуку (Рассеет, Бурбанк Ньюолив и Супериор Ньюолив);

1 линия сахарной свеклы, устойчивая к глифосату;

1 линия риса, устойчивая к глюфосинату аммония;

5 видов генетически модифицированных микроорганизмов.

В этой связи уместно остановиться на проблеме маркировки продуктов, содержащих ГМИ. В мире существуют различные подходы к маркировке пищевых продуктов. Так, в США, Канаде и Аргентине такие продукты не маркируются каким-либо

особым образом; в Японии и Австралии принят 5%-й уровень содержания ГМИ в продуктах, обязательный для маркировки, в странах Евросоюза — 0,9 %-й.

Система маркировки пищевой продукции из ГМИ существует в России с 1999 г. Однако она носила рекомендательный характер. В соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормами СанДиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», с 1 сентября 2002 г. была введена обязательная маркировка пищевых продуктов, полученных с применением ГМО. Маркировке подлежала вся пищевая продукция, содержащая в своем составе более 5 % трансгенных компонентов.

В 2004 г. санитарно-эпидемиологическими правилами и нормами СанПиН 2.3.2.1842-04 введены Дополнения и изменения № 3 к СанПиН 2.3.2.1078-01, которые, вслед за принятием Директивы Европейского Парламента и Совета от 22.09.2003 № 1829/2003, снижают в России пороговый уровень маркировки пищевых продуктов, содержащих ГМИ, с 5 % до 0,9 %.

Минздрав России считает целесообразным ввести в Российской Федерации обязательную маркировку всей пищевой продукции, содержащей более 0,9 % компонентов из ГМИ, а пищевую продукцию, содержащую 0,9 % и менее компонентов из ГМИ, считать генетически модифицированной и не подлежащей маркировке.

Пищевые продукты, полученные из ГМО, прошедшие медико-биологическую оценку и не отличающиеся по изученным свойствам от своих аналогов, полученных традиционными методами, являются безопасными для здоровья человека, разрешены для реализации населению и использования в пищевой промышленности без ограничений.

В соответствии с рекомендациями международных организаций и с законодательством РФ, в нашей стране пищевая продукция из ГМИ подлежит обязательной оценке на безопасность. Однако необходимо дальнейшее проведение обязательного широкомасштабного и длительного исследования безопасности ГМО, а также и экологических последствий использования ГМ-продуктов.

Несмотря на распоряжения Госсанэпиднадзора, как показали проверки в супермаркетах и магазинах, маркируется только ничтожная часть ГМ-продуктов. При этом уровень ГМИ в них превышает не только 0,9 % (установленную норму), но даже 50 % и выше. Даже если товар маркирован, не каждый рядовой потребитель знает, что значок «ARDEX F» означает присутствие изолята (концентраты) соевого белка. Россияне лишены еще одной подсказки на наличие ГМ-продуктов: во всем мире продукты из ГМ-сырья дешевле натуральных, а в России они продаются по цене натуральных.

В 2006 г. вышло Письмо Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 03.04.2006 № 0100/3572-06-32 «О совершенствовании надзора за пищевыми продуктами, содержащими ГМО», в котором отмечено, что в России «имеется необходимая нормативно - методическая база, включая методы лабораторных исследований, необходимые для организации и проведения эффективного надзора за пищевыми продуктами, содержащими компоненты, полученные с применением ГМО».

Особенно часто в 2005 г. ГМИ встречались в мясных продуктах — 15,8 % (2004 г. — 20,5 %; 2003 г. — 14,8 %), в группе продуктов «прочие» (в основном растительные белки) — 10,8 % (2004 г. — 16,7 %; 2003 г. — 16,4 %), в птицеводческих продуктах — 9,1 % (2004 г. — 15,4 %; 2003 г. — 29,5 %).

В 2005 г. наибольший удельный вес пищевых продуктов, содержащих компоненты ГМИ, приходился на Северо-Западный (11,7 %), Уральский (11,2 %), Приволжский (8,4 %), Центральный (8,2 %) и Сибирский (8 %) федеральные округа.

Наибольшее количество исследований пищевых продуктов на наличие ГМИ в 2005 г. проведено в Центральном (5506), Приволжском (3579), Южном (2952) и Сибирском (2925) федеральных округах, наименьшее — в Уральском федеральном округе (631). Вместе с тем в территориальных управлениях Роспотребнадзора по республикам Ингушетия и Саха (Якутия), Ненецкому, Ханты-Мансийскому, Таймырскому,

Эвенкийскому, Усть-Ордынскому, Чукотскому, Корякскому автономным округам по-прежнему не проводится исследование пищевых продуктов на наличие ГМИ.

Одной из основных задач в области предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в результате воздействия биологических факторов является обеспечение безопасности продуктов питания, производимых из генетически модифицированных источников, а также безопасности экологической системы от проникновения чужеродных биологических видов организмов; прогнозирование генетических аспектов биологической безопасности и создание системы государственного контроля за оборотом генетически модифицированных материалов.

### **1. 10 Лекция №10 (2 часа).**

**Тема: «Стандартизация, принципы контроля и сертификации биопрепаратов»**

#### **1.10.1 Вопросы лекции:**

1. Законодательная база сертификации
2. Правила по проведению сертификации
3. Нормативные документы, на соответствие которым проводится сертификация
4. Контроль качества биопрепаратов

#### **1.10.2 Краткое содержание вопросов**

##### **1. Законодательная база сертификации.**

Государственная сертификация ветеринарных препаратов, используемых для профилактики, лечения и диагностики болезней животных, направлена на получение высококачественных, экологически чистых продуктов сельскохозяйственного производства. Она контролирует безопасность препаратов для окружающей среды и населения, помогает выбрать качественные препараты, создает необходимые условия для рыночной деятельности поставщиков и потребителей.

Известно, что сертификация является новой формой управления и слежения за качеством продукции, использующей эффективные принципы управления. Она приобрела значительную актуальность и развитие, стала широко использоваться во всем мире.

Вопросы управления качеством ветеринарных препаратов посредством сертификации поставлены особенно остро в связи с изменением производственных взаимоотношений и переходом к рынку.

В целях организации российской системы сертификации ветеринарных препаратов с 15 ноября 1983 г. Госстандартом России впервые введен в действие «Порядок сертификации ветеринарных препаратов». Этот документ действует в рамках Системы сертификации ГОСТР. Организацию, координацию и методическое руководство по сертификации ветеринарных препаратов по совместному приказу Госстандарта и Минсельхозпрада России осуществляет центральный орган системы сертификации ветеринарных препаратов (ЦОС) - ВГНКИ. Ему предоставлено право проведения соответствующих работ и выдачи сертификатов. При ЦОС функционирует Совет Системы и Апелляционная комиссия.

Основные положения системы сертификации ветеринарных препаратов состоят в следующем:

- сертификация производится с целью подтверждения посредством сертификата того, что ветеринарный препарат соответствует требованиям определенных стандартов или технических условий. При этом по существу, обеспечивается независимая проверка качества препарата третьей стороной. В конечном итоге основная цель сертификации - защита потребителя от некачественной, нестандартной продукции, от возможной недобросовестности изготовителей и поставщиков препаратов;

- ветеринарные препараты и корма вошли в номенклатуру продукции, подлежащей обязательной сертификации. Данная номенклатура утверждена постановлением Госстандарта;

- при сертификационных испытаниях качество препаратов оценивается по всем показателям, заложенным в нормативную документацию на препарат, в том числе в обязательном порядке по безопасности и показателям эффективности;

- в течение срока действия сертификата устанавливается инспекционный контроль за качеством сертификационных препаратов.

При нарушении требований к нормативным документам орган по сертификации имеет право (на основании результатов контроля) аннулировать действующие сертификаты.

Для проведения работ по сертификации разработана, утверждена и используется следующая основополагающая документация:

- порядок и правила проведения работ по сертификации ветеринарных препаратов;

- методика формирования сети организаций Системы сертификации ветеринарных препаратов;

- правила проведения экспертизы нормативной документации на соответствие требованиям по сертификации;

- правила внутреннего аудита и ревизий за деятельность органа по сертификации и другие документы.

Обязательная сертификация ветеринарных препаратов осуществляется в следующем порядке.

Заявитель предоставляет в ЦОС (ВГНКИ) заявку на проведение сертификации препарата. Вместе с заявкой представляются копии ГОСТа, ОСТА или технических условий на препарат, регистрационного удостоверения Департамента ветеринарии, аттестата производства препарата, а также образцы препарата (не менее трех серий) в количестве, позволяющем провести двукратные испытания показателей его качества и заложить арбитражные пробы на хранение на срок действия сертификата или стандартные образцы основных активно действующих веществ препарата и аналитические паспорта на них (при необходимости), а также образцы маркировки транспортной и потребительской тары препарата. Помимо этого представляется код общероссийского классификатора продукции (ОКП) для препарата и другие сведения о препарате по усмотрению заявителя.

ЦОС рассматривает представленные материалы и принимает решение о возможности сертификации препарата.

Таким образом, впервые в России разработана и внедрена Система управления качеством продукции посредством сертификации, базирующаяся на международном опыте и действующая в рамках Системы сертификации ГОСТР; система сертификации ориентирована на условия рыночной экономики и способна гарантировать потребителям соответствие препаратов установленным требованиям.

ВОЗ (World Health Organization) обнародовала на своем официальном сайте новые требования к вакцинам и биологическим препаратам.

В связи с этим «надлежащая производственная практика (GMP) для вакцин и другой биологической продукции», действующая с 1991 года, будет пересмотрена в ближайшее время. Экспертный комитет по биологической продукции уже вынес на рассмотрение Проект изменений данного документа. Изменения были разработаны на основании консультаций, инициированных ВОЗ в июле 2014 г., в которых принимали участие представители регулирующих органов, лабораторий контролирующих качество, производителей, ученых из разных стран мира. Кроме этого, новый формуляр должен будет включать замечания, внесенные во время публичного обсуждения нормативов опубликованных на сайте ВОЗ, которые можно будет фиксировать до сентября 2015 года.

Документ будет рекомендован, как основа и справочник, для внесения изменений в национальные нормативные акты, регламентирующие организацию производства,

контроля качества и тестирования биологической продукции, а в дальнейшем для коррекции валидационных протоколов изготавителей биопрепаратов. Изменения должны коснуться практических всех производственных процессов:

- Роста штаммов микроорганизмов и эукариотов;
- Извлечения веществ из биологических тканей, в том числе животных, грибов, растений и человека;
- Гибридомной технологии;
- Размножения микроорганизмов в эмбрионах и тканях животных;
- Техники получения рекомбинантных ДНК.

Законодательной базой проведения сертификации продукции в России является в первую очередь Закон Российской Федерации «О защите прав потребителей». Отношения в области сертификации регулируются также Законом РФ «О сертификации продукции и услуг» и издаваемыми в соответствии с ним актами законодательства Российской Федерации. Закон «О защите прав потребителей» регулирует права потребителей на приобретение продукции и услуг надлежащего качества, безопасность их жизни и здоровья, получение информации о продукции и ее изготавителях, государственную и общественную защиту их интересов. По закону потребитель имеет право на то, чтобы продукция при обычных условиях ее использования, при хранении и транспортировке была безопасна для его жизни, здоровья, окружающей среды. Впервые в законодательной практике России в законе сформулированы положения, давшие начало практическому использованию обязательной сертификации в экономике страны для защиты внутреннего рынка от потенциально опасной продукции.

Законом предусматривается, что реализация продукции без сертификата, подтверждающего соответствие продукции установленным требованиям, запрещается. Законом даны полномочия государственным органам управления, осуществляющим в пределах своей компетенции контроль за безопасностью продукции, направлять предписания об устранении нарушений требований по безопасности продукции, о снятии с производства и реализации такой продукции, предъявлять иски в суды к изготавителям в случае нарушения ими требований по безопасности продукции. По Закону «О защите прав потребителей» Госстандарт России, являясь национальным органом по сертификации продукции и услуг, определяет порядок их сертификации, номенклатуру, подлежащую обязательной сертификации, осуществляет контроль за правильностью проведения сертификации продукции и услуг.

Закон «О сертификации продукции и услуг» устанавливает правовые основы обязательной и добровольной сертификации продукции и услуг в Российской Федерации. Если выделить главное, то получится, что закон определяет Госстандарт России, как орган, формирующий и реализующий государственную политику в области сертификации.

В России может проводиться как обязательная, так и добровольная сертификация. В соответствии с указанным законом Госстандарт России устанавливает общие правила и рекомендации по проведению сертификации на территории Российской Федерации и опубликовывает официальную информацию о них, проводит государственную регистрацию систем сертификации и знаков соответствия. Фундаментальным положением закона является то, что обязательная сертификация осуществляется в случаях, предусмотренных законодательными актами Российской Федерации. Это означает, что для введения обязательной сертификации объекта хозяйственной деятельности необходимо принятие закона или указа Президента.

## **2. Правила по проведению сертификации.**

На основе вышеуказанных законов Госстандартом России разработаны «Правила по проведению сертификации в Российской Федерации». Этот документ устанавливает цели, принципы, общие правила, а также рекомендации по проведению обязательной и добровольной сертификации и распространяется на сертификацию продукции. Правилами

должны руководствоваться все органы и организации при создании системы сертификации и ее проведении. Правилами также установлены основные понятия по сертификации, в том числе способ (форма, схема) сертификации, идентификации продукции.

Наряду с «Правилами по проведению сертификации в Российской Федерации» постановлением Госстандарта России № 15 от 21.09.1994 года введен в действие «Порядок проведения сертификации продукции в Российской Федерации». Данный порядок устанавливает, что при сертификации проверяются характеристики (показатели качества) продукции и используются методы испытаний, позволяющие:

- провести идентификацию продукции, в том числе проверить принадлежность к классификационной группировке, соответствие технической документации, происхождение, принадлежность к данной партии;

- полно и достоверно подтвердить соответствие продукции требованиям, направленным на обеспечение ее безопасности для жизни, здоровья и имущества граждан, окружающей среды. Установлены требования в нормативных документах для этой продукции.

Документ устанавливает, что схемы, применяемые при обязательной сертификации, определяются Госстандартом России, другими органами исполнительной власти в пределах своей компетенции, на которые законодательными актами РФ возлагаются организация и проведение работ по обязательной сертификации. При этом учитываются особенности производства, испытаний, требуемый уровень доказательности, возможные затраты заявителя.

Схему добровольной сертификации определяет заявитель и предлагает ее органу по сертификации.

Документ определяет также требования к нормативным документам на сертифицируемую продукцию. В нормативных документах должны быть установлены характеристики (показатели качества) продукции и методы испытаний, позволяющие обеспечить полное и достоверное подтверждение соответствия продукции этим требованиям и ее идентификацию.

В соответствии с этим документом сертификация продукции включает:

- подачу заявки на сертификацию;
- принятие решения по заявке, в том числе выбор схемы;
- отбор, идентификацию образцов и их испытания;
- оценку производства (если это предусмотрено схемой сертификации);
- анализ полученных результатов и принятия решения;
- выдачу сертификата и лицензии на применение знака соответствия;
- осуществление инспекционного контроля за сертифицированной продукцией;
- корректирующие мероприятия при нарушении соответствия продукции установленным требованиям.

### **3. Нормативные документы, на соответствие которым проводится сертификация.**

Поскольку обязательная сертификация вводится законодательными актами Российской Федерации, для ее проведения используются нормативные документы общегосударственного федеративного статуса. Они содержат требования и нормы, обязательные для всех субъектов хозяйственной деятельности на территории РФ. Большинство этих требований и норм устанавливается государственными стандартами (ГОСТ) России, поэтому они являются основными нормативными документами, используемыми при обязательной сертификации. Наряду с ГОСТами при обязательной сертификации используются правила, утвержденные соответствующими органами государственного управления (строительные нормы и правила, санитарные правила и нормы и др.).

Фонд стандартов, использование которого предусматривается при проведении обязательной сертификации потребительских товаров, достаточно велик (более 15 тыс.) и охватывает почти полностью все виды соответствующей продукции. Однако разработка этих стандартов не была ориентирована на возможность их использования при сертификации. В связи с этим Госстандарт России определил «Перечень установленных государственными стандартами обязательных требований по безопасности товаров для жизни и здоровья потребителей». В этом документе для каждого товара, подлежащего обязательной сертификации, указаны государственные стандарты и другие нормативные документы общегосударственного статуса, а также пункты этих стандартов, которыми определяются требования, подлежащие проверке. При добровольной сертификации вид нормативного документа, соответствие которому необходимо подтвердить, заявитель выбирает сам. Он может прибегнуть к услугам любой системы, в которой используется такой нормативный документ, как ГОСТ, международный или региональный стандарт или технические условия самого изготовителя.

#### **4. Контроль качества биопрепаратов.**

Система государственного контроля производства и качества биопрепаратов была введена с 1931 г., когда был организован Всесоюзный институт по контролю ветеринарных препаратов - ВГНКИ. В первые годы существования институт контролировал ветеринарные препараты, изготавливаемые биопредприятиями и производственными отделами ветеринарно-бактериологических институтов, силами своих сотрудников (до 20% серий каждого препарата после выпуска его для использования в практических условиях). Такой контроль не мог предотвратить выпуска недоброкачественной продукции.

По этой причине в 1933 г. директивными органами было принято решение о реорганизации государственного контроля биопрепаратов с обеспечением предварительного контроля всей выпускаемой предприятиями продукции.

Для повышения эффективности государственного контроля и приближения его к месту изготовления препаратов вместо филиалов ВГНКИ на всех биопредприятиях и производственных учреждениях в 1934 г. были созданы контрольные лаборатории, возглавляемые государственными контролерами Наркомзема СССР, которые в своей деятельности подчинялись институту. ВГНКИ и его контролерам было дано право полностью или частично приостанавливать производство и выпуск биопрепаратов в тех случаях, когда они не соответствуют нормативной документации по параметрам качества.

С января 1967 г. произошли изменения в системе государственного контроля, благодаря чему в штат ВГНКИ на должности госконтролеров были переведены начальники контрольных лабораторий предприятий с выполнением задачи сплошного госконтроля качества препаратов сотрудниками ВГНКИ.

При переходе предприятий на новые формы управления и хозяйствования, с 1991 г. госконтролеры ВГНКИ переведены в штат предприятий Главагробиопрома, где они возглавили отделы биологического контроля. При этом вся ответственность за качество производимых биопрепаратов легла на предприятия-изготовители продукции. Вместе с тем была повышена ответственность и усилен контроль со стороны профильных лабораторий и других подразделений ВГНКИ.

В 1995 г. Главным Государственным ветеринарным инспектором Российской Федерации утвержден руководящий нормативный документ Положение об отделе (отделении) биологического и технологического контроля субъекта хозяйствования, производящего препараты ветеринарного назначения.

Отдел (отделение) биологического и технологического контроля (ОБК, ОБТК) организаций (предприятий) различных форм собственности является структурным подразделением основного производства, осуществляющим независимо от администрации, организации оценку качества препаратов ветеринарного назначения.

Начальник ОБТК по административным вопросам подчиняется к директору организации и наравне с ним отвечает за полноту, точность своевременность осуществляемого контроля, а также за выпуск продукции, не соответствующей требованиям нормативных документов (НД).

ОБТК, как структурное подразделение основного производства, должен быть аттестован в соответствии с Методическими указаниями о порядке аттестации предприятий, изготавливающих ветеринарные препараты утвержденными Главным управлением ветеринарии Минсельхоза России 08.05.92.

Основными задачами и функциями ОБТК являются:

- организация входного и технологического контроля качества сырья и материалов, используемых для производства и выпуска препаратов, и определение их соответствия требованиям нормативных документов (сертификатов). При несоответствии их требованиям действующих государственных и отраслевых стандартов или технических условий, начальник ОБТК вправе ставить вопрос перед руководителем организации о запрещении использования сырья, животных, эмбрионов, ингредиентов, питательных сред и других материалов на любом участке производства;
- осуществление контроля за правильным хранением, поддержанием, использованием и учетом производственных штаммов микроорганизмов в производственном процессе. Участие в комиссионной приемке производственных штаммов микроорганизмов, получаемых из ВГНИИ и других учреждений;
- поддержание, хранение и ведение учета штаммов вирусов, бактерий, грибов, применяемых для контроля препаратов;
- контроль качества каждой изготовленной серии препарата по всем показателям, указанным в НД, ведение документации по изготовлению, контролю и выпуску продукции. Предотвращение выпуска организацией продукции, не соответствующей требованиям государственных и отраслевых стандартов, технических условий, фармакопейных статей;
- документальное подтверждение соответствия препарата требованиям НД, выдача письменного заключения (паспорта) о пригодности для практического применения реализуемых препаратов, прошедших контроль, и присваивание проверенным сериям препаратов соответствующих номеров контроля;
- отбор образцов, выпущенных для реализации препаратов, с целью хранения их в музее архивных образцов ОБТК и обеспечение и учета режима хранения в соответствии с требованиями ОСТ 10-07-001-93

Препараты ветеринарные. Правила приемки. Методы отбора проб и Положения о музее архивных образцов ветеринарных, препаратов ОБТК организации, утвержденного Главным госветинспектором Российской Федерации 19.04.95;

- контроль за соблюдением требований НД на упаковку, маркировку, транспортировку и хранение полуфабрикатов и готовой продукции;
- контроль за соблюдением инструкций и правил о порядке заготовки и санитарной обработки животных, используемых для производства и контроля препаратов, за их содержанием и кормлением. Участие в проведении клинико-диагностических исследований животных, поступивших в карантин организации;
- постоянный контроль за санитарным состоянием производственных помещений и территорий организаций;
- участие в испытании новых и усовершенствовании освоенных препаратов, а также в рассмотрении нормативной документации на них;
- проверка рекламаций на качество препаратов, поступающих с мест применения, информирование дирекции организации, ВГНИИ о ее результатах.

Нормативно-техническая документация на препарат

Основными нормативно-техническими документами на препарат являются:

- Государственные (ГОСТ), отраслевые (ОСТ) стандарты или технические условия (ТУ);

- наставление по применению препарата.

Кроме них предприятие-изготовитель должно иметь инструкцию по изготовлению и контролю препарата или промышленный (технологический) регламент на производство препарата.

ГОСТ, ОСТ или ТУ включают в себя контроль качества биопрепарата контроль за расфасовкой, маркировкой и упаковкой препарата, условия его транспортирования, хранения и срок годности и требования безопасности труда при изготовлении препарата. ГОСТ, ОСТ или ТУ бывают использованы для сертификации данного препарата.

ГОСТ, ОСТ или ТУ в установленном порядке должны быть утверждены руководителем предприятия-изготовителя и согласованы с заместителем руководителя Департамента ветеринарии Минсельхоза России и директором ВГНКИ.

Для контроля качества препарата согласно ОСТ 10-07-001 от каждой серии должно быть отобрано определенное количество ампул (флаконов) (к примеру, из выборки в 20 ампул (флаконов) 10 используют для испытаний, а остальные 10 хранят в архиве предприятия-изготовителя).

При проведении контроля учитывают внешний вид препарата, отсутствие в нем посторонней примеси, плесени, герметичность укупорки ампул (флаконов) и отсутствие в них трещин. В сухом препарате определяют массовую долю влаги, его растворимость, в большинстве случаев - наличие вакуума в ампулах (флаконах).

Наиболее важными показателями контроля качества биопрепарата являются: стерильность инактивированных препаратов или отсутствие контаминации бактериальной или грибной микрофлорой живых вакцин и антигенов, безвредность, реактогенность, эффективность (иммуногенность).

Контроль живых противобактерийных вакцин на чистоту, а инактивированных и анатоксинов на стерильность проверяют высеvами на питательные среды - МПА, МГШ, МПБ с глюкозой, бульон и агар Сабуро и Чапека, бульон и агар Мартена, МППБ под маслом и другие среды, обеспечивающие рост как аэробных, так и анаэробных бактерий и грибов. Часто для этих целей используют специальные селективные среды и тиогликолевую среду. Отсутствие роста микроорганизмов на указанных средах свидетельствует о стерильности препаратов. В высеvах из живой вакцины должен быть рост только того микробы, штамм которого использовался для ее изготовления. Контаминация вакцины посторонней микрофлорой не допускается.

Проверку на стерильность противовирусных вакцин осуществляют высеvами их на питательные среды - МПА, МПБ, МППБ, Сабуро, тиогликолевую.

На МПА, МПБ с глюкозой, МППБ под маслом, агаре Сабуро, среде Чапека осуществляется контроль на стерильность лечебно-профилактических и диагностических сывороток. На этих же средах проводится контроль на стерильность диагностических стандартных антигенов и аллергенов. Препараты должны быть стерильными.

Безвредность является одним из главных качеств для любого ветеринарного препарата. Для определения безвредности вакцину вводят животным парентерально в дозах, максимально переносимых для лабораторных животных, а для сельскохозяйственных животных они должны быть в 2 - 10 раз больше иммунизирующих доз. Срок наблюдения за животными должен быть не менее 10 сут. Безвредность новых и инактивированных препаратов определяют по выживаемости или гибели привитых животных (чаще лабораторных), характерным клиническим признакам болезни и др.

Иногда требуется обязательное изучение патолого-морфологических изменений у животных, павших или убитых в разные сроки после прививки. Это важно особенно при изготовлении новых, чаще живых вакцин.

Лечебно-профилактические сыворотки проверяют на безвредность на морских свинках массой по 300 - 400 г, когда им подкожно вводят по 10 мл препарата (по 5 мл с обеих сторон). Для этих целей можно использовать кроликов. В течение 10-ти суточного наблюдения животные должны оставаться клинически здоровыми, не иметь заметных

местных или общих реакций. При наличии таких изменений контроль повторяют на удвоенном количестве подобных животных. При повторном неудовлетворительном результате контроля на безвредность вся серия препарата бракуется.

Реактогенность живых и инактивированных вакцин определяют по наличию у иммунизированных животных общей температуры и воспалительных реакций в месте введения препарата с вовлечением регионарных лимфатических узлов, а также по другим показателям.

Иммуногенность вакцин определяют в опытах на иммунизированных животных путем их заражения или исследуют сыворотки крови привитых животных на наличие в них специфических антител. Препарат вводят однократно не менее 10 подопытным животным. Через определенный срок (в зависимости от вакцины) всех подопытных и 10 контрольных (не привитых) животных заражают вирулентным штаммом аналогичным вакцинному или инактивированному штамму. Вакцину считают иммуногенной при выживании без признаков болезни не менее 8 подопытных животных. Допускается заболевание трех вакцинированных животных при 100% гибели (заболевании) контрольных.

Об иммуногенной активности препарата можно судить также по наличию в сыворотках крови вакцинированных животных специфических антител в определенных титрах, а также по концентрации антигенов в вакцинах и анатоксинах (или по титрам вакцинных штаммов вирусов в культурах клеток и на куриных эмбрионах).

Вместе с тем, при изготовлении некоторых живых вирусных вакцин определяют инфекционную активность. К примеру, инфекционную активность вируса в сухой культуральной вакцине против чумы свиней из штамма К (ВГНКИ) определяют на кроликах массой 2-3 кД. Титр вируса должен быть не ниже 104,0 ИД50/мл.

Активность лечебно-профилактических сывороток проверяют на животных путем введения внутрибрюшинно, внутримышечно или подкожно. Через 20 - 24 ч после инъекции сыворотки животным вводят смертельную дозу контрольного вирулентного штамма соответствующего микроорганизма. Подопытные животные должны оставаться здоровыми минимум 14 сут при гибели или заболевании контрольных (не привитых) животных. В отдельных случаях допускается переболевание одного-двух подопытных животных при 100 % гибели или заболевании контрольных.

Активность некоторых лечебно-профилактических сывороток определяют в реакциях агглютинации или нейтрализации. Активность диагностических сывороток проверяют в соответствующих реакциях: связывания комплемента, нейтрализации, гемагглютинации, иммунофлуоресценции и других.

Эпизоотологическую эффективность новых биопрепараторов (вакцин, сывороток) по разрешению Департамента ветеринарии РФ определяют в условиях двух-трех неблагополучных хозяйств по той инфекции, против которой предназначен препарат.

К нормативно-техническим документам на препарат должна прилагаться пояснительная записка, в которой дается обоснование выбранным методам и тестам контроля качества препарата.

После проведения контроля биопрепарата по всем параметрам, определенным в стандарте качества или ТУ, ОБТК предприятия даст письменное заключение о пригодности для практического применения реализуемого биопрепарата.

Наставление по применению препарата включает в себя следующие разделы: общие сведения, биологические (фармакологические) свойства, порядок применения препарата и порядок предъявления рекламаций.

Наставление по применению препарата в установленном порядке должно быть утверждено руководителем Департамента ветеринарии Минсельхоза России или его заместителем.

## 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

### **2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).**

**Тема:** «Получение и накопление культур сенной и картофельной палочек»

**2.1.1 Цель работы:** получить накопительные культуры сенной (*Bacillus subtilis*) и картофельной (*Bacillus subtilis var mesentericus*) палочек

**2.1.2 Задачи работы:**

1. Подготовить материал для культивирования сенной и картофельной палочек
2. Отметить интенсивность развития культур микроорганизмов, просмотреть их под микроскопом и зарисовать.

**2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. чашки Петри, конические колбы, ножницы, мел, вата, фильтровальная бумага, электроплитка

Объект исследования: сено, клубни картофеля

**2.1.4 Описание (ход) работы:**

Накопительными называются культуры, в которых преобладает одна группа или даже один вид микроорганизмов. Для получения накопительной культуры создаются элективные условия, обеспечивающие преимущественное развитие лишь данной группы или данного вида микроорганизмов и неблагоприятные – для развития сопутствующих форм микробов.

Получение культуры сенной палочки (*Bacillus subtilis*)

Сено из разнотравья мелко нарезают и помещают в колбу объемом 500 мл, заполняя её на четверть объема, добавляют 100-150 мл воды и щепотку мела. Смесь кипятят 15-20 минут, пока среда не приобретет цвет настоя крепкого чая. Сенной отвар разливают в подготовленные конические колбы слоем 1-1,5 см, закрывают ватными пробками и помещают в термостат при температуре 25 °C или вблизи радиатора центрального отопления.

Через двое суток на поверхности среды развивается беловатая пленка *Bacillus subtilis*, которая при старения на третьи-четвертые сутки становится серовато-зеленоватой. Другие микроорганизмы при этом вырастают редко и в небольших количествах.

Получение культуры картофельной палочки (*Bacillus subtilis var mesentericus*)

Промытые клубни картофеля, не очищая, нарезают кружочками. Поверхность их натирают мелом для нейтрализации среды и помещают в чашки Петри на двойной слой фильтровальной бумаги, смоченной водой. Чашки ставят в термостат с температурой 27-30 °C на трое-четверо суток. На поверхности ломтиков картофеля образуется плотная морщинистая пленка культуры картофельной палочки. Окраска пленки может быть разной: беловато-серой, розоватой, желто-бурой, черной, - что зависит от разновидностей культуры, получивших преимущественное развитие.

### **2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).**

**Тема:** «Антагонизм микроорганизмов»

**2.2.1 Цель работы:** исследовать антагонистические свойства между различными группами микроорганизмов.

**2.2.2 Задачи работы:**

1. Выполнить посев культур микроорганизмов на питательной среде.

**2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Чашки Петри с МПА, микробиологические петли, спиртовки,

Объект исследования: чистые культуры *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*

**2.2.4 Описание (ход) работы:**

На микроорганизмы воздействуют не только абиотические факторы внешней среды, но и другие микроорганизмы, живущие в одной и той же среде. Взаимоотношения между ними могут быть разными: метаболизм, паразитизм, симбиоз, антагонизм. В случае антагонистических отношений микроорганизмы выделяют в окружающую среду продукты обмена веществ, которые могут либо угнетать рост других микроорганизмов, либо убивать их.

На поверхность застывшего МПА, находящегося в чашке Петри, микробиологической петлей наносят широкую полоску культуры *Bacillus cereus*, перпендикулярно к ней параллельными штрихами высевают культуры *Bacillus subtilis* и *Sarcina lutea*. Чашки помещают в термостат при температуре 25-28 °С. Через неделю наблюдают результаты опыта.

### **2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).**

**Тема: «Антагонизм микроорганизмов»**

**2.3.1 Цель работы:** исследовать антагонистические свойства между различными группами микроорганизмов.

**2.3.2 Задачи работы:**

1. Результаты опыта занести в таблицу и зарисовать, сделать вывод о взаимоотношениях различных микроорганизмов, находящихся в одной среде.

**2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Чашки Петри с МПА, микробиологические петли, спиртовки,

Объект исследования: чистые культуры *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*

**2.3.4 Описание (ход) работы:**

На микроорганизмы воздействуют не только абиотические факторы внешней среды, но и другие микроорганизмы, живущие в одной и той же среде. Взаимоотношения между ними могут быть разными: метаболизм, паразитизм, симбиоз, антагонизм. В случае антагонистических отношений микроорганизмы выделяют в окружающую среду продукты обмена веществ, которые могут либо угнетать рост других микроорганизмов, либо убивать их.

*Bacillus subtilis* является антагонистом по отношению к двум другим микроорганизмам, поэтому в непосредственной близости от культур не будет роста обеих бактерий, на некотором удалении наблюдается слабый рост и лишь на значительном расстоянии рост культур окажется нормальным.

### **2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа).**

**Тема: «Определение чувствительности микроорганизмов к различным фитонцидам»**

**2.4.1 Цель работы:** выяснить чувствительность микроорганизмов к действию различных фитонцидов.

**2.4.2 Задачи работы:**

1. Посеять культуры бактерий в чашки Петри на МПА

2. Внести фитонциды

3. Результаты записать в таблицу и зарисовать, сделать выводы о чувствительности различных микроорганизмов к фитонцидам.

**2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. чашки Петри с мясо-пептонным агаром, микробиологические петли,

2. чеснок, лук, хрень, редька, лимон

3. стеклянный шпатель, пипетки, спиртовки

Объект исследования: чистые культуры микроорганизмов *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*

#### **2.4.4 Описание (ход) работы:**

Фитонциды являются веществами, создаваемыми растениями в процессе обмена веществ. Характерное свойство этих веществ губительное действие на микроорганизмы (бактерии и плесневые грибы). Иногда их действие ограничивается только задержкой роста. В качестве фитонцидов можно использовать чеснок, репчатый лук, хрень, редьку, лимон и др.

В стерильные, предварительно просушенные чашки Петри разливают по 10-15 мл МПА. На поверхность среды высевают суспензию супочной культуры микроорганизмов, пипеткой берут 0,02 мл этой суспензии (одна капля) и стерильным шпателем растирают досуха на питательной среде в чашке Петри у пламени горелки.

Затем, измельчая растительный материал на шинковке или терке, готовят кашицу из растений, содержащих фитонциды (чеснок, репчатый лук, хрень, редька, лимон). Кашицу помещают на агар в чашки Петри. Делать это надо быстро, так как бактерицидной действие зависит от быстроты и степени измельчения материала. Одну чашку оставляют для контроля, т.е. производят посев, но не вносят фитонциды.

после того как произведен посев и внесены фитонциды, все чашки Петри помещают в термостат и оставляют стоять там в течение 36-48 ч при температуре 25 °С. По истечении указанного срока их вынимают и просматривают, отмечая различное развитие бактерий в контроле и под воздействием разных фитонцидов.

### **2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).**

**Тема: «Образование лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger*»**

**2.5.1 Цель работы:** изучить особенности образования лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger* в различных условиях выращивания.

#### **2.5.2 Задачи работы:**

1. Приготовить питательные среды для культивирования гриба *Aspergillus niger*.
2. Выполнить остановку опыта.
3. Результаты опыта записать в таблицу и зарисовать. Сделать выводы об образовании лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger* в различных условиях.

#### **2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

20%-й раствор сахарозы; 10%-е растворы NH<sub>4</sub>N<sub>0</sub>3, K<sub>2</sub>P<sub>0</sub>4, MgS<sub>0</sub>4, FeS<sub>0</sub>4; колбы емкостью 100 мл; цилиндры емкостью 100 мл; пипетки на 10 и 1 мл; препаровальные иглы; вата.

Объект исследования: культура гриба *Aspergillus niger*.

#### **2.5.4 Описание (ход) работы:**

Готовят 200 мл полной питательной среды без микроэлементов, %: сахароза — 10,0; NH<sub>4</sub>N<sub>0</sub>3 — 0,3; K<sub>2</sub>P<sub>0</sub>4 — 0,2; MgS<sub>0</sub>4 — 0,05; FeS<sub>0</sub>4 — 0,01.

Определяют исходную кислотность раствора с помощью pH-метра.

Питательную среду тщательно перемешивают и разливают по 50 мл в четыре конические колбочки, каждая емкостью 150 мл. Закрывают ватными пробками.

Все колбочки вносят равное количество спор гриба. Колбы подписывают и ставят в термостат при 28-30 °С.

На шестой день, когда пленка гриба достигнет большой мощности, проводят следующий опыт. Из колбы № 1 вынимают мицелий гриба, тщательно промывают с нижней стороны водой. Пленку гриба высушивают при 105 °С в сушильном шкафу до постоянного веса. С помощью pH-метра определяют кислотность фильтрата. Из колбы № 4 аккуратно сливают фильтрат и под мицелий подводят 50 мл свежей среды, после чего колбу помещают в термостат.

На седьмой день определяют кислотность фильтрата и сухой вес мицелия из колбы № 2 описанным выше способом.

На восьмой день определяют кислотность фильтрата и сухой вес мицелия из колб № 3 и 4 описанным выше способом

В результате этой работы могут быть получены следующие данные.

Первое время гриб интенсивно накапливает кислоту до тех пор, пока в среде достаточно сахара (колбы № 1 и 2), из которого он может синтезировать кислоту. Однако как только среда истощается (опыт продолжается в прежних условиях), мицелий гриба продолжает увеличиваться в весе, но гриб начинает перерабатывать кислоту, питаясь от части за ее счет (колба № 3). Культура же, получившая подкормку сахаром (колба № 4), дает значительный скачок в сторону большего накопления кислоты и увеличения сухого веса мицелия.

## **2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).**

**Тема: «Получения каллусов из незрелых зародышей пшеницы»**

**2.6.1 Цель работы:** получить каллусы из незрелых зародышей и узлов кущения пшеницы.

### **2.6.2 Задачи работы:**

1. Приготовить зерновки.
2. Приготовить питательные среды, провести культивирование
3. Через две — четыре недели рассмотреть каллусные клетки под микроскопом и зарисовать, сделать выводы о морфологии каллусов

### **2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. ламинар-бокс,
2. пробирки с питательной средой МС, 6%-й раствор хлорамина, стерильная дистиллированная вода,
3. препаровальные иглы, пинцеты, скальпели, стерильная бумага, флаконы с 96%-м спиртом, спиртовка.

**Объект исследования:** растения пшеницы в стадии молочной спелости, пробирочные растения пшеницы.

### **2.6.4 Описание (ход) работы:**

Каллусы из различных органов пшеницы на искусственных питательных средах впервые были получены в 1968 г. Их можно использовать для изучения солеустойчивости и устойчивости к температурному стрессу, для получения суспензии и протопластов. Для индукции каллусогенеза обычно используют стерильные пробирочные растения, выращенные из зародышей на средах без гормонов. Растения для получения каллусов можно вырастить в теплице Для этого набухшие семена помещают на пять недель в холодную камеру на яровизацию при 2 °C, проростки высаживают в вегетационные сосуды и выращивают до достижения молочной спелости. Незрелые зародыши выделяют и переносят на питательные среды.

Для получения каллусной ткани незрелые зародыши пшеницы изолировать на 12-е сутки от начала цветения. Незрелые зерновки поместить в дезинфицирующий раствор на 5 мин. Промыть три раза стерильной дистиллированной водой. Простерилизованные зерновки поместить в стерильные чашки Петри. Препаровальной иглой вычленить зародыши и перенести в пробирки с питательными средами. Пробирки с зародышами закрыть пробками и поставить в штатив. Культивируют в светлой культуральной комнате при 25 °C.

Пробирочные растения пшеницы выложить на стерильные бумажные матрасики и разрезать на небольшие части по 5-10 мм, выделить междуузлия с участками листового влагалища. Перенести экспланты в пробирки на питательные среды МС + 2,4-Д в концентрации 4 мг/л. Культивируют в светлой культуральной комнате при 25 °C.

## **2.7 Лабораторная работа №7 (2 часа).**

**Тема: «Получение каллусов из корешков фасоли»**

**2.7.1 Цель работы:** получить каллус из корешков фасоли.

**2.7.2 Задачи работы:**

1. Подготовить семена фасоли для культивирования.

2. Подготовить среду для культивирования семян фасоли.

3. Через три недели рассмотреть в микроскоп и зарисовать сформировавшийся каллус.

**2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. чашки Петри с питательными средами для индукции каллусогенеза, стерильные чашки Петри, 6%-й раствор хлорамина, препаровальные иглы, пинцеты, скальпели, флаконы со спиртом и стерильной дистиллированной водой.

Объект исследования: семена фасоли.

**2.7.4 Описание (ход) работы:**

Каллусы можно получать из разных частей растения, и том числе из кончиков корней. Образование каллуса происходит в области первичных и вторичных меристем. Процесс каллусообразования зависит от размера экспланта. Оптимальная величина экспланта 5-10 мм<sup>3</sup>, масса 20-100 мг. Многие ткани имеют физиологическую полярность. Поэтому каллус лучше образуется на той стороне экспланта, которая ближе к апикальным меристемам корня. Кончики корней легко образуют каллус, если они помещены на среду горизонтально, тогда как сегменты стебля лучше формируют каллус, если их поместить вертикально. Для культивирования на питательных средах лучше использовать стерильные корешки, полученные при проращивании семян в стерильных условиях.

Семена фасоли поместить в чашки Петри (по 15 семян в чашку), залить раствором хлорамина до полного погружения семян в жидкость и оставить на 20 мин. Промыть семена стерильной дистиллированной водой три раза. Стерильные семена залить стерильной водой и оставить для набухания на 24 ч.

Семена с разрушенной кожурой удалить, а жизнеспособные семена простерилизовать повторно 6%-м раствором хлорамина в течение 20 мин. Промыть семена стерильной дистиллированной водой три раза. Семена перенести в стерильные чашки Петри (по пять семян в чашку).

Стерильным пинцетом придерживать семя, а стерильным скальпелем надрезать оболочку. Стерильным скальпелем и препаровальной иглой изолировать корешки (2-3 мм) и перенести в чашки Петри со стерильной дистиллированной водой (по 15 корешков в чашку).

Корешки стерильной препаровальной иглой поместить на поверхность агаризованной среды и слегка вдавить в агар для обеспечения хорошего контакта с питательной средой (среда: МС + 20 г/л сахарозы + 100 мг/л мезоинозита + 2 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л кинетина). Культивируют в светлой культуральной комнате при 25 °C или в термостате.

## **2.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).**

**Тема: «Субкультивирование каллусов»**

**2.8.1 Цель работы:** исследовать характер роста каллуса картофеля.

**2.8.2 Задачи работы:**

1. Подготовить каллусную культуру картофеля

2. Подготовить питательную среду для культивирования каллусной культуры.

3. По результатам взвешиваний через одну, две, три и четыре недели построить кривую роста каллуса. Кроме снятия ростовых показателей, отмечать цвет и консистенцию каллусной ткани. Результаты культивирования зарисовать через две — четыре недели. Рассчитать (в %) интенсивность роста каллусной ткани.

**2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. ламинар-бокс,

2. пробирки с питательной средой для культивирования каллусов,
  3. препаровальные иглы, пинцеты, флакон с 96%-м спиртом, спиртовка.
- Объект исследования: каллусная культура клеток картофеля.

#### **2.8.4 Описание (ход) работы:**

В цикле выращивания каллусные клетки после ряда делений проходят обычный онтогенез: растут растяжением, дифференцируются и деградируют. Рост каллуса можно отразить S-образной кривой роста. Ростовой цикл начинается с посадки экспланта на среду (начало культивирования), а завершается в момент прекращения митозов (стационарная фаза). В лаг-фазе (латентной фазе) клетки не делятся, не увеличиваются в размере, имеют низкую метаболическую активность. В экспоненциальной фазе (фазе логарифмического роста) клетки активно делятся митозом. В ранней экспоненте увеличивается количество митохондрий (синтезируется АТФ), рибосом, всех видов РНК, синтезируются белки, активизируется метаболизм, интенсивно поглощается кислород. Поздняя экспонента характеризуется снижением удельной скорости роста, замедлением клеточного деления, увеличением среднего размера клеток за счет растяжения. В стационарной фазе (фаза плато) размер клеток продолжает увеличиваться, а их деление прекращается. В поздней стационарной фазе (фаза деградации) за счет истощения среды клетки стареют и отмирают. Продолжительность ростового цикла каллусных клеток 21-28 дней. В процессе культивирования каллус пассируют (пересаживают на свежую питательную среду) каждые четыре — шесть недель в зависимости от интенсивности роста. Масса транспланта (фрагмента ткани, который пассируют на свежую питательную среду) составляет 60-100 мг на 20-40 мл питательной среды.

В асептических условиях извлечь каллусы из пробирок и поместить на стерильную поверхность. Стерильной препаровальной иглой выделить зоны меристематической активности (белые мелкие клетки). Транспланты величиной 2-3 мм поместить на поверхность питательной среды (среда: МС + 30 г/л сахарозы + 1 мг/л НУК + 0,8 мг/л БАП). Культивируют в светлой культуральной комнате при 25 °С или в термостате.

Обычно цикл выращивания составляет четыре недели. За это время для построения кривой роста каллус взвешивают четыре раза, т. е. через каждые семь дней.

По результатам взвешиваний через одну, две, три и четыре недели построить кривую роста каллуса. Кроме снятия ростовых показателей, отмечать цвет и консистенцию каллусной ткани. Результаты культивирования зарисовать через две — четыре недели. Рассчитать (в %) интенсивность роста каллусной ткани по формуле

$$ИР = (t_2 - t_1) : t_1 \times 100 \%,$$

где ИР — интенсивность роста;  $t_1$  — масса каллусной ткани в начале пассажа;  $t_2$  — масса каллусной ткани в конце пассажа.

### **2.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).**

**Тема: «Получение и культивирование суспензии картофеля»**

**2.9.1 Цель работы:** получить суспензионную культуру картофеля и изучить влияние различных гормонов на ее рост.

#### **2.9.2 Задачи работы:**

1. Приготовить питательные среды
2. Результаты культивирования суспензии зари совать и сделать выводы о влиянии различных по составу сред на образование суспензионной культуры.

#### **2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. ламинар-бокс,
2. колбы с питательной средой (МС + 3 мг/л 2,4-Д) для инициаций суспензии,
3. круговые качалки, магнитные мешалки, стерильные инструменты, флакон с 96%-м спиртом.

Объект исследования: пробирки с рыхлыми каллусами картофеля.

#### **2.9.4 Описание (ход) работы:**

Суспензионные культуры — это одиночные клетки, мелкие, средние и крупные агрегаты (группы клеток), выращиваемые в жидкой питательной среде при постоянной аэрации (доступ кислорода) в асептических условиях. Суспензии получают из каллусов. Для инициации суспензионной культуры необходимо 2-3 г свежей рыхлой массы каллусных клеток на 60-100 мл жидкой питательной среды. Первичную суспензию культивируют в колбах с жидкой питательной средой на круговых качалках со скоростью 100-120 об/мин. Кривая роста суспензии имеет S-образную форму и включает лаг-фазу, экспоненциальную фазу, стационарную фазу и фазу деградации. Форма ростовых кривых отличается продолжительностью фаз. Это зависит от генетики популяции, количества инокулюма и состава питательной среды. Скорость нарастания биомассы колеблется от 15 до 70 суток. Суспензии используют для получения различных химических веществ: органических кислот, ферментов, алкалоидов, красителей, белков, аминокислот. Их применяют в фармакологии, парфюмерии, пищевой и химической промышленности, сельском хозяйстве. Суспензионные культуры имеют большое значение для генетики, особенно молекулярной биологии: из суспензионных клеток получают протопласты, необходимые для соматическом гибридизации, генетической инженерии, а также для изучения метаболизма клеток.

Приготовить питательные среды: а) МС + 3 мг/л 2-4-Л-Б; б) МС + 1 мг/л ИУК; в) МС + 3 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л БАИ; г) МС без гормонов.

В асептических условиях извлечь каллус из пробирки и поместить в колбу с питательной средой из расчета 2-3 г на 100 мл среды. Колбы с суспензией поместить на круговые качалки при 100-120 об/мин и оставить на три-четыре недели (для первого пассажа).

Пассирование суспензионной культуры осуществляют каждые две недели следующим образом: суспензии дают отстояться 1-2 мин и переливают 5-10 мл суспензии в колбу со свежей средой (обычно в пропорции 1 : 10, т. е. в колбу емкостью 500 мл помещают 5 мл исходной суспензии и 45 мл свежей среды). Пересадив суспензию, ставят колбы на качалку до следующей пересадки.

### **2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).**

#### **Тема: «Кислотный гидролиз крахмала»**

**2.10.1 Цель работы:** провести кислотный гидролиз крахмала и определить составляющие его компоненты.

#### **2.10.2 Задачи работы:**

1. Приготовить крахмальный клейстер
2. Выполнить постановку опыта

3. Результаты опыта записать в таблицу и зарисовать. Сделать вывод о причинах изменения окраски растворов, указать время, в течение которого произошел полный гидролиз крахмала

#### **2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. крахмал, 20%-й НС1, раствор Люголя, Na<sub>2</sub>C0<sub>3</sub>, Феллингова жидкость,
2. электроплитка,
3. колбы, мерный цилиндр, стакан химический, штатив с пробирками, пипетки.

#### **2.10.4 Описание (ход) работы:**

Крахмал представляет собой полисахарид. Его молекула состоит из большого количества остатков глюкоз, соединенных попарно в мальтозы. Крахмал нерастворим в холодной воде, а в горячей образует коллоидный раствор — крахмальный клейстер. При кипячении крахмального клейстера с минеральной кислотой крахмал гидролизуется до глюкозы через ряд промежуточных продуктов с постепенно уменьшающейся

молекулярной массой, называемых декстринами. Проследить за процессом гидролиза крахмала можно с помощью реакции с раствором йода, который окрашивает крахмал в синий цвет, амилодекстрин — в фиолетовый, эритродекстрин — в оранжевый, а с мальтодекстрином и мальтозой окрашивания уже не дает (остается желтым).

Приготовить 0,1%-й крахмальный клейстер. Для этого отвесить 100 мг крахмала, высыпать крахмал в стаканчик добавить 10 мл воды и тщательно размешать стеклянной палочкой. Налить в колбу 90 мл воды, нагреть до кипения, вылить в нее содержимое стаканчика, взболтать, дать раствору еще раз закипеть и снять с огня.

Поставить в штатив шесть-семь пробирок. Отлить в первую пробирку 3 мл крахмального клейстера. Добавить в колбу с крахмальным клейстером 5 мл 20%-го НС1 и нагревать на электроплитке. При появлении первых пузырьков (начало кипения) отлить из колбы 3 мл во вторую пробирку. Продолжать кипятить содержимое колбы, отливая из нее через каждые 5 мин по 3 мл в следующие пробирки. Дать пробам в пробирках остить, разбавить их водой и добавить по пять капель раствора Люголя. Если окрашивание проб йодом отсутствует, гидролиз можно считать оконченным. Проделать с раствором, оставшимся в колбе, реакцию на редуцирующие сахара: налить 2-3 мл жидкости в чистую пробирку, нейтрализовать кислоту содой, прилить равный объем Феллинговой жидкости и довести до кипения.

## **2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).**

**Тема: «Приготовление питательных сред для культивирования культур клеток»**

**2.11.1 Цель работы:** приготовить питательные среды для культивирования клеток.

**2.11.2 Задачи работы:**

1. Приготовить растворы Хенкса и Эрла, определить pH, при необходимости довести pH до 7,2 -7,4.

2. Приготовить ростовую питательную среду с добавлением бычьей сыворотки, освободить от бактериальной микрофлоры и проверить чистоту посевом на питательные среды.

**2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. бидистиллированная вода,
2. NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, глюкозы, 0,2%-го фенолрота, Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>.

### **2.11.4 Описание (ход) работы:**

Для культивирования клеток большинство питательных сред готовят на сбалансированном солевом растворе, для которого необходимы высокоочищенные препараты, так как следы ряда примесей (свинец, ртуть и другие тяжелые металлы) токсичны для клеток. Солевые растворы готовят на бидистиллированной воде. Они обеспечивают сохранение pH, осмотического давления в клетках, соответствующую концентрацию необходимых неорганических веществ. Лучшими из них являются растворы Хенкса и Эрла. Эти растворы — обязательный компонент любой питательной среды.

*Раствор Хенкса:* На 1 л бидистиллированной воды берут

NaCl — 8,0 г, KCl — 4,0 г, MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O — 2,0 г, CaCl<sub>2</sub> — 1,4 г, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—0,6 г, глюкозы — 10 г, 0,2%-го фенолрота— 4,0 мл, Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> — 0,6 г.

*2. Раствор Эрла:* на 1 л бидистиллированной воды добавляют— NaCl — 6,8 г, KCl— 0,4 г, CaCl<sub>2</sub>—0,2г, MgSO<sub>4</sub> —0,1 г, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—0,125 г, NaHCO<sub>3</sub>—2,2 г, глюкозы— 1,0г.

Для определения в солевых растворах и питательных средах концентрации водородных ионов (pH) применяют индикатор феноловый красный (0,002%). Он не оказывает токсического воздействия на клетки и вирусы. При сдвигах pH в щелочную

сторону растворы принимают красно-малиновую окраску, в кислую — желтую. При нейтральном значении pH (7,2...7,4) цвет среды оранжево-красный. Для регулирования pH солевых растворов и питательных сред используют 7,5%-ный раствор бикарбоната натрия  $\text{NaHCO}_3$  и 3% -ный раствор уксусной кислоты  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Эти растворы готовят на бидистиллированной воде, стерилизуют кипячением и хранят в холодильнике при 4...6 °C не более месяца.

*Питательные среды.* Различают искусственные (полусинтетические и синтетические) и естественные питательные среды.

Естественные питательные среды — это биологические жидкости (сыворотка крови, эмбриональный экстракт, асцитическая жидкость, коровья амниотическая жидкость, тканевые экстракти и др.).

Питательные среды из естественных компонентов применяют редко, главным образом для выращивания вновь изолированных тканей в начале культивирования и для поддержания очень прихотливых тканей животных.

К полусинтетическим питательным средам относят гемогидролизаты, гидролизат лактальбумина, аминопептид и др.

Лучшей искусственной питательной средой является синтетическая среда 199. Она содержит 60 компонентов: 10 аминокислот, 17 витаминов, 8 минеральных солей, 10 компонентов, входящих в состав нуклеиновых кислот и др.

Кроме того, среды подразделяются на ростовые и поддерживающие. Ростовые применяются в 1-ой фазе культивирования клеток. Они богаты питательными веществами и способствуют активному размножению клеток (например, 5%-ный гемогидролизат + 10% бычьей сыворотки). Поддерживающие среды применяют во 2-ой фазе культивирования клеток — после заражения культуры клеток вирусами. Они поддерживают жизнеспособность клеток. Из поддерживающих сред обычно исключают сыворотку.

Для уничтожения микрофлоры перед использованием в среды добавляют пенициллин (100 ЕД/мл), стрептомицин (50 ЕД/мл), тетрациклин (100 ЕД/мл), устанавливают pH 7,2...7,4; в ростовые среды, кроме того, вносят 10% бычьей сыворотки.

## **2.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).**

**Тема:** «Определение общей и биологической концентрации микроорганизмов»

**2.12.1 Цель работы:** определить концентрацию микроорганизмов разными методами.

### **2.12.2 Задачи работы:**

1. Подсчитать количество колоний в чашках Петри.
2. Определить концентрацию микроорганизмов по оптической плотности .
3. Определить количество клеток в камере Горяева
4. Результат оформить в таблице.

### **2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Взвесь микробной культуры
2. Фотоколориметр
3. Чашки Петри с культурами микроорганизмов
4. Камера Горяева

### **2.12.4 Описание (ход) работы:**

**Определение количества бактерий.** При характеристике развития микробной популяции, санитарной оценке кормов, продуктов питания, при вычислении показателя вирулентности микроорганизма необходимо устанавливать количество микробных клеток в единице объема того или иного материала.

Определение общего количества микроорганизмов. Можно применять метод прямого счета и метод измерения светорассеяния.

Метод прямого счета: бактерии подсчитывают в камерах Горяева, Тома или в окрашенных мазках. В последнем случае 0,01 мл бактериальной суспензии

микропипеткой наносят на предметное стекло и равномерно распределяют на 1 см<sup>2</sup>. Мазок фиксируют, окрашивают и подсчитывают клетки в 10... 15 полях зрения по диагонали квадрата. Определяют среднее число клеток в одном поле зрения. Делят 1 см<sup>2</sup> на площадь поля зрения, которую измеряют методом микрометрии (см. тему 1), затем частное умножают на среднее число микробных клеток в поле зрения, получают их количество в 0,01 мл взвеси бактерий.

Метод измерения светорассеяния считают более точным. Количество света, рассеиваемого суспензией бактерий, пропорционально их концентрации. Этот показатель достаточно точно можно измерить при помощи фотоэлектроколориметра. Зависимость между оптической плотностью и концентрацией клеток различна для бактерий разных видов. Поэтому при работе с таким прибором для каждого вида бактерий необходимо строить свою калибровочную кривую зависимости.

На практике широко используют простой субъективный метод, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой бактериальной суспензии с так называемым «стандартом мутности», выпускаемым Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Стандарт представляет собой взвешенные в воде частицы стекла «Пирекс» и состоит из трех запаянных пробирок-эталонов (5, 10 и 20 международных единиц). Мутность стандарта на 10 ед. соответствует следующим концентрациям: для бактерий кишечной группы —  $0,93 \cdot 10^9$  кл/мл; коклюшной группы —  $11 \cdot 10^9$  кл/мл; для бруцеллезных бактерий —  $1,7 \cdot 10^9$  кл/мл; туляремийных микробов —  $5 \cdot 10^9$  кл/мл.

Мерной пипеткой вносят 0,1...0,5 мл исследуемой бактериальной суспензии в пустую пробирку, соответствующую по диаметру и толщине стенок пробирке «стандарта мутности». К суспензии добавляют физиологический раствор до оптической плотности стандарта на 10 ед. Физиологический раствор вносят небольшими мерными порциями, записывая его количество и сравнивая мутность опытной и стандартной пробирок невооруженным глазом на фоне специальной шрифтовой таблицы. Зная, во сколько раз развели исследуемую бактериальную суспензию, чтобы уравнять ее оптическую плотность со стандартом, можно рассчитать содержание микробных клеток в 1 мл исходной суспензии.

Например, в пробирку поместили 0,1 мл суспензии бактерий, содержащей неизвестное количество клеток. Для уравнивания оптической плотности исследуемой суспензии со стандартом мутности 10 ед. в пробирку добавили 0,9 мл физиологического раствора, т. е. исходную суспензию развели в 10 раз. Известно, что суспензия данного вида бактерий при оптической плотности 10 ед. содержит  $1,3 \cdot 10^9$  кл/мл. Следовательно, концентрация исследуемой суспензии составляет  $1,3 \cdot 10^{10}$  кл/мл.

При работе с бактериями, для которых нет данных о содержании микробных клеток в 1 мл относительно «стандарта мутности», необходимо предварительно методом прямого счета определить их количество в суспензии, например, оптической плотностью 10 ед.

Определение количества живых микроорганизмов. Метод основан на выводе, что бактериальная колония — это результат деления единичной клетки на плотной питательной среде (исключение составляют бактерии, образующие цепочки из клеток).

Мерной пипеткой объемом 1 мл добавляют 1 мл культуры *E. coli* в бактериологическую пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора, подогретого до 37...38 °C (разведение 10-1). Далее аналогичным способом готовят разведения культуры от  $10^{-2}$  до  $10^{-8}$ . Для каждого разведения используют новую пипетку того же объема и класса. Из пяти последних пробирок суспензию бактерий по 0,1 мл наносят на поверхность подсушенного МПА в две чашки Петри. Внесенный материал стерильным шпателем распределяют по поверхности питательной среды. Посевы инкубируют при 37...38 °C 24 ч.

Учет результатов: в чашках Петри, где выросло более 150...300 и менее 10 колоний, результаты не учитывают. Выбирают чашки Петри с параллельными посевами (из одного разведения), содержащими 10... 150 колоний. Подсчитывают колонии на чашках из одного разведения, суммируют, определяют среднее число колоний и с учетом степени разведения рассчитывают содержание жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц) в 1 мл исходной суспензии бактерий.

Культура	Количество колоний	Оптическая плотность	Количество клеток в камере Горяева
<i>E. coli</i>			
<i>S. aureus</i>			

### 2.13 Лабораторная работа №13 (2 часа).

**Тема: «Определение антимикробной активности антибиотиков»**

**2.13.1 Цель работы:** определить антимикробную активность антибиотиков в отношении *E.coli*, *S. aureus*

**2.13.2 Задачи работы:**

1. Определить чувствительность культуры стафилококка к антибиотикам методом бумажных дисков. Оформить результат в виде таблицы

**2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Антибиотики.
2. Питательные среды с культурами *E.coli*, *S. aureus*.

**2.13.4 Описание (ход) работы:**

**Антибиотики.** Эти вещества, образуемые бактериями, грибами, растениями, животными тканями, способны убивать микроорганизмы или подавлять их рост. Абсолютное большинство известных антибиотиков получают из актиномицетов. Бактерии синтезируют такие антибиотики, как полимиксины, грамицидины, бацитрацин, гризин. Из грибов выделены пенициллины, цефалоспорины, фумагиллин, гризофульвин, из животных тканей — эритрин, экмолин, из высших растений — аллицин и др. Часть антибиотиков получают химическим синтезом (левомицетин), а большинство — биосинтезом. Активность препаратов определяют бактериологическими или физико-химическими методами. Биологическую активность антибиотиков выражают в условных единицах действия — ЕД. За 1 ЕД принимают специфическую активность, содержащуюся в 1 мкг чистого препарата, но для бензил пенициллина 1 ЕД равна 0,5988 мкг химически чистой натриевой соли препарата. Активность товарных антибиотиков чаще всего выражают в мкг активного вещества, содержащегося в 1 мг препарата.

Успех лечения инфекционных заболеваний человека и животных зависит от выбора эффективного лекарственного средства с учетом чувствительности к нему возбудителя болезни. Материал для лабораторного исследования следует брать до лечения антимикробными препаратами. Чувствительность микроорганизма к антибиотикам определяют с чистой культурой возбудителя.

**Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.** К ним относят метод диффузии в агар, метод серийных разведений (на жидкой и плотной питательных средах) и ускоренные методы.

**Метод диффузии в агар** (метод бумажных дисков). Это наиболее простой в исполнении метод. В качестве питательной среды применяют МПА, агар на переваре Хоттингера с содержанием 120...140мг% аминного азота (рН 7,2...7,4) или агар фирмы «Дифко». Диски с антибиотиками (диаметр 5...6 мм) готовят из специальных сортов

фильтровальной бумаги. Каждый диск содержит определенное количество антибиотика, которое указано на этикетке флакона. Во флакон насыпают силикагель, который впитывает влагу и служит индикатором: при переувлажнении меняет окраску с синей на розовую. При изменении окраски силикагеля во флаконе диски для использования непригодны. Флаконы с дисками хранят при температуре 4...20 °C.

Расплавленную питательную среду разливают в чашки Петри по 20 мл (толщина слоя 4...5 мм). Перед посевом чашки со средой досушивают в термостате. Для посева используют суточную бульонную культуру или смывы суточной агаровой культуры. 1 мл микробной суспензии в физиологическом растворе (концентрация клеток  $10^9$ /мл) наносят на агар и покачиванием чашки распределяют по поверхности питательной среды. Избыток жидкости удаляют стерильной пастеровской пипеткой. Засеянные чашки Петри подсушивают при комнатной температуре 30...40 мин, а затем на поверхность среды стерильным пинцетом накладывают, плотно прижимая, диски с разными антибиотиками на расстоянии 2 см друг от друга и от края чашки. Чашки с дисками выдерживают в термостате при 37 °C 18 ч в положении вверх дном.

Антибиотик из диска диффундирует в агар, вызывая гибель чувствительных бактерий, формируя таким образом вокруг диска зону отсутствия роста. Ближе к диску концентрация антибиотика в агаре выше, по мере удаления от диска концентрация снижается. Следовательно, чем больше диаметр зоны задержки роста вокруг антибиотика, тем более чувствительна к нему исследуемая культура.

Диаметр зоны задержки (отсутствия) роста микроорганизмов измеряют с помощью линейки или миллиметровой бумаги с точностью до 1 мм. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизмов вокруг диска указывает на устойчивость исследуемой культуры к данному антибиотику. При зоне задержки роста до 14 мм говорят о малой чувствительности к антибиотику, от 15 до 25 мм — о достаточной чувствительности, свыше 25 мм — о высокой чувствительности.

**Метод серийных разведений.** Для проведения опыта готовят основные растворы антибиотиков, используя стандарты антибиотиков. На этикетке ампулы со стандартом указана концентрация антибиотика в ЕД/мл или мкг/мл. Навески бензил пенициллина калиевой или натриевой соли, ампициллина тригидрата, оксациллина натриевой соли, цефалотина, цефалексина растворяют в 1/15M фосфатном буфере. Основные растворы тетрациклических антибиотиков готовят на 0,01 н. растворе соляной кислоты. Для приготовления основных растворов нео-, моно-, канамицина используют дистиллированную воду. Концентрация основных растворов антибиотиков 1000 мкг/мл.

Метод серийных разведений на жидкой питательной среде: при определении чувствительности к антибиотикам для основной массы микроорганизмов используют МПБ или бульон на переваре Хоттингера, для стрептококков в среду добавляют 1 % глюкозы, для патогенных грибов используют среду Сабуро.

Агаровые или бульонные культуры микроорганизмов предварительно разводят физиологическим раствором до концентрации клеток  $5 \cdot 10^6$ /мл.

Учет результатов: наименьшее количество антибиотика, дающее визуально полную задержку роста (бульон прозрачный), соответствует минимальной подавляющей концентрации препарата (МПК). Минимальную бактерицидную концентрацию (МБцК) определяют высеиванием на плотные питательные среды из последних прозрачных пробирок, которые предварительно встрихивают. Наименьшее количество антибиотика в пробирке, содержимое которой после инкубирования в течение 24...72 ч не дало роста бактерий при высеивании на питательную среду, принимают за МБцК.

Метод серийных разведений на плотной питательной среде: для определения чувствительности к антибиотикам большинства микроорганизмов используют МПА или агар на переваре Хоттингера с содержанием аминного азота 120...140 мг/мл, pH 7,2...7,4. Приготовленный основной раствор антибиотиков разводят в плотной питательной среде. Для этого к расплавленному и охлажденному до 55 °C агару, разлитому в широкие

пробирки по 18 мл, добавляют по 2 мл соответствующего разведения определенного антибиотика, тщательно перемешивают и переливают в стерильную чашку Петри. После застывания агара чашки Петри подсушивают в течение 1 ч. Контрольные чашки Петри с агаром не содержат антибиотика. Все чашки Петри делят на сектора, каждый из которых засевают исследуемой культурой. Посев делают бактериологической петлей из микробной суспензии с концентрацией клеток  $10^6\ldots 10^7$ /мл. Чашки помещают в термостат при 37 °C на 20…24 ч.

Наименьшую концентрацию антибиотика, при которой наблюдают полную задержку роста бактерий на агаре или рост единичных колоний, принимают за МПК препарата. В том случае, когда рост культуры отсутствует на всех чашках, кроме контрольной, считают, что исследуемые концентрации антибиотиков превышают МПК препарата. Если на всех чашках отмечают рост культуры, это значит, что микроорганизм устойчив ко всем концентрациям антибиотика.

Таблица

Наименование антибиотиков	Диаметр задержки роста (мм)			
	<i>E. coli</i>	Чувствительность	<i>S. aureus</i>	Чувствительность
Пенициллин				
Стрептомицин				
Канамицин				
Тетрациклин				
Ампициллин				
Нистатин				

## 2.14 Лабораторная работа №14 (2 часа).

Тема: «Обнаружение амилазы в прорастающих семенах»

**2.14.1 Цель работы** изучить изменение активности амилаз в ходе прорастания семян.

### 2.14.2 Задачи работы:

1. Приготовить крахмальный агар.
2. Выполнить постановку опыта.
3. Результаты опыта зарисовать. Сделать вывод об изменении активности амилаз при прорастании различных семян.

### 2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Чашки Петри с крахмальным агаром, стакан с водой, раствор Люголя (1 г йодида калия, 1 г кристаллического йода в 100 мл дистиллированной воды), скальпель, пинцет.

Объект исследования: проросшие и непроросшие семена пшеницы.

### 2.14.4 Описание (ход) работы:

Ферменты могут действовать не только в той клетке, которая их вырабатывает, но и вне ее, в том числе при выделении во внешнюю среду. Чтобы наблюдать быстрое выделение ферментов из клеток семян злаков, необходимо разрезать зерновки, так как семенная кожура и околоплодник препятствуют диффузии веществ.

Под действием фермента амилазы происходит гидролиз крахмала. В растениях встречаются две амилазы: осамилаза, вызывающая распад крахмала на крупные молекулы (декстрины), и (З-амилаза, которая отщепляет от крахмала концевые остатки мальтозы. В сухих семенах пшеницы, ржи, ячменя содержится только (З-амилаза, причем почти вся она связана с белками. При прорастании Р-амилаза переходит из связанного состояния в свободное, и, кроме того, происходит синтез а-амилазы.

Приготовить крахмальный агар. Для этого: взвесить 2 г агара, поместить в колбу, прилит 100 мл воды и осторожно кипятить до полного растворения агара; 2 г крахмала размешать стеклянной палочкой с 10 мл холодной воды, вылить в кипящий раствор агара и вновь довести до кипения. Горячую смесь разлить в чашки Петри и дать застыть.

Разрезать несколько непроросших зерен пшеницы пополам, слегка смочить водой и разложить пинцетом на одной половине чашки Петри с крахмальным агаром поверхностью среза вниз, не вдавливая семена в агар. На другую половинку чашки Петри поместить несколько проросших семян того же растения, также разрезанных пополам и смоченных водой (желательно оставить на некоторых проросших семенах корешки), и приложить их к поверхности крахмального агара. Закрыть чашки Петри, чтобы не было подсыхания семян. Через час осторожно снять семена и облить всю поверхность крахмального агара слабым раствором Люголя. Отметить, что в тех местах, где были размещены проросшие семена, агар не прокрасился, т. е. остался бесцветным.

### **2.15 Лабораторная работа №15 (2 часа).**

**Тема: «Получение микроклубней картофеля *in vitro*»**

**2.15.1 Цель работы** изучить процесс клубнеобразования у проростков картофеля.

**2.15.2 Задачи работы:**

1. Провести наблюдение процесса клубнеобразования через четыре, шесть и восемь недель после начала культивирования. Результаты зарисовать, сделать выводы на основании теории гормональной регуляции. Заложить микроклубни на хранение.

**2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. ламинар-бокс, стерильные чашки Петри, пробирки с питательной средой для получения микроклубней, препаровальные иглы, пинцеты, скальпели, флаконы с 96%-м спиртом для стерилизации инструментов, спиртовка, вата.

**Объект исследования:** стерильные проростки картофеля с пятью-шестью сформированными листьями в пробирках.

#### **2.15.4 Описание (ход) работы:**

В практике биотехнологии на искусственных питательных средах с определенным набором биологически активных веществ можно укоренить побеги, а также индуцировать образование микроклубней. Для этого обычно используют среды с высоким содержанием минеральных солей (МС), углеводов (сахарозы — до 8 % от объема среды), цитокининов, абсцисовой кислоты, хлорхолинхлорида.

В течение первых 10-12 суток после черенкования растения выращивают на обычном фотопериоде (16-17-часовом) с интенсивностью освещения 3-5 Клк, при температуре 25 °C днем и 19-20 °C ночью. Последующее культивирование проводят на 12-часовом фотопериоде при тех же степени освещенности и температуре.

В некоторых случаях после выращивания в условиях длинного дня пробирки переносят в холодильник с температурой 10 °C. Образование микроклубней происходит через месяц-полтора.

Микроклубни хранят в холодильнике при температуре +5 °C и влажности воздуха до 95 %. Их закладывают в стерильные пробирки без среды по 10 микроклубней в каждую и закрывают пробками (срок хранения — до шести месяцев). Таким образом создаются условия, соответствующие периоду покоя картофеля, что способствует лучшей всхожести и жизнеспособности растений.

Весь период — от микрочеренкования до получения микроклубней — составляет 60-65 дней.

В стерильных условиях стерильными инструментами извлечь проростки с хорошо сформированными корнями из пробирок и перенести на питательные среды для индукции клубнеобразования. Пробирки с пересаженными в них растениями закрыть и перенести в культуральную комнату. В ходе опыта соблюдать световой и температурный режим.

Заложить микроклубни на хранение четыре недели — при температуре 37-38 °C и влажности воздуха 70-80 %. Дважды в день песок увлажнять, через 7-10 дней провести подкормку раствором Кнопа и микроэлементов по прописи среды МС: 5 мл маточного раствора на 1 л раствора Кнопа.

Проростки, прошедшие термотерапию, поместить в 6 % - й раствор хлорамина на 5 мин, промыть стерильной дистиллированной водой. В ламинар-боксе под микроскопом вы членить апикальные меристемы и поместить их в пробирки с питательными средами. Весь растительный материал перенести в культуральную комнату с нормальными условиями.

Клубни жаровыносливых сортов можно сразу выращивать при температуре 37-38 °С и влажности воздуха 70 %. Режим тепловой обработки для каждого сорта подбирают экспериментально.

Результаты зарисовать через две, четыре, шесть и восемь недель, сделать выводы о влиянии высокой температуры на зараженный посадочный материал.

**Модифицированная питательная среда Мурасиге — Скуга (МС) для клубнеобразования у картофеля**

Компоненты питательной среды Мурасиге-Скуга: Маточный раствор макросолей - 50 мл/л; Маточный раствор микросолей - 1 мл/л; Fe-хелат - 5 мл/л; CaCl<sub>2</sub> - 5 мл/л; Тиамин-НС1 - 1 мг/л; Пиридоксин-НС1 - 0,5 мг/л; Никотиновая кислота - 0,5 мг/л; Аскорбиновая кислота - 1 мг/л; Кинетин - 0,5 мг/л; Сахароза - 50 г/л; Агар-агар - 7 г/л; (рН 5,8-6,0).

## **2.16 Лабораторная работа №16 (2 часа).**

**Тема: «Изучение методики выделения изолированных протопластов»**

**2.16.1 Цель работы:** получить изолированные протопласти механическим методом.

### **2.16.2 Задачи работы:**

1. Приготовить растворы сахарозы в концентрациях 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; 0,7 М.

2. Отметить раствор, в котором обнаружены изолированные протопласти, и зарисовать их.

### **2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1 М раствор сахарозы, дистиллированная вода, пробирки, штативы для пробирок, пипетки на 10 мл, стерильные препаровальные иглы, лезвия, стеклянные палочки, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага.

Объект исследования: кусочки растительных тканей (окрашенная эпидерма чешуи лука).

### **2.16.4 Описание (ход) работы:**

Изолированный протопласт представляет собой содержимое растительной клетки, окруженное плазмалеммой. Целлюлозная стенка у него отсутствует.

Изолированные протопласти одни из наиболее ценных объектов в биотехнологии. При их слиянии происходит образование гибридных клеток. В изолированные протопласти достаточно легко вводить генетическую информацию из органелл и клеток других растений, прокариотических организмов и из клеток животных, что имеет важное значение как в теоретическом, так и практическом отношении.

Приготовить в пробирках растворы сахарозы в концентрациях 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; 0,7 М. Опустить в пробирки с растворами кусочки растительных тканей (окрашенная эпидерма чешуи лука), что приводит к плазмолизу, позволяющему видеть протопласт в целой клетке. Через 10-15 мин извлечь растительную ткань из пробирок и положить на предметные стекла в каплю соответствующего раствора. Придерживая стеклянной палочкой, разрезать ее на тонкие полоски, оставляя неразрезанным общий конец. Осторожно провести препаровальной иглой по ткани, выдавливая в раствор содержимое разрушенных клеток. Убрать ткань, каплю раствора накрыть покровным стеклом, рассмотреть препарат в микроскоп с целью обнаружения изолированных протопластов.

**Примечание.** Механический метод извлечения изолированных протопластов дает очень небольшой выход целых протопластов. Он требует большой аккуратности и высокой точности исполнения. Растворы сахарозы разной концентрации позволяют выбрать один раствор, водный потенциал которого будет близок к водному потенциальну клеток растительной ткани. В этом растворе с наибольшей вероятностью будут сохраняться целые протопласти.

### **2.17 Лабораторная работа №17 (2 часа).**

**Тема:** «Изучение методики выделения изолированных протопластов»

**2.17.1 Цель работы:** получить изолированные протопласти механическим методом.

#### **2.17.2 Задачи работы:**

1. Приготовить растворы сахарозы в концентрациях 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; 0,7 М.

2. Отметить раствор, в котором обнаружены изолированные протопласти, и зарисовать их. Сделать выводы.

#### **2.17.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1 М раствор сахарозы, дистиллированная вода, пробирки, штативы для пробирок, пипетки на 10 мл, стерильные препаровальные иглы, лезвия, стеклянные палочки, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага.

Объект исследования: кусочки растительных тканей (окрашенная эпидерма истьев begonii или традесканции).

#### **2.17.4 Описание (ход) работы:**

Изолированный протопласт представляет собой содержимое растительной клетки, окруженное плазмалеммой. Целлюлозная стенка у него отсутствует.

Изолированные протопласти одни из наиболее ценных объектов в биотехнологии. При их слиянии происходит образование гибридных клеток. В изолированные протопласти достаточно легко вводить генетическую информацию из органелл и клеток других растений, прокариотических организмов и из клеток животных, что имеет важное значение как в теоретическом, так и практическом отношении.

Приготовить в пробирках растворы сахарозы в концентрациях 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; 0,7 М. Опустить в пробирки с растворами кусочки растительных тканей (окрашенная эпидерма листьев begonii или традесканции), что приводит к плазмолизу, позволяющему видеть протопласт в целой клетке. Через 10-15 мин извлечь растительную ткань из пробирок и положить на предметные стекла в каплю соответствующего раствора. Придерживая стеклянной палочкой, разрезать ее на тонкие полоски, оставляя неразрезанным общий конец. Осторожно провести препаровальной иглой по ткани, выдавливая в раствор содержимое разрушенных клеток. Убрать ткань, каплю раствора накрыть покровным стеклом, рассмотреть препарат в микроскоп с целью обнаружения изолированных протопластов.

Задание. Отметить раствор, в котором обнаружены изолированные протопласти, и зарисовать их. Сделать выводы.

**Примечание.** Механический метод извлечения изолированных протопластов дает очень небольшой выход целых протопластов. Он требует большой аккуратности и высокой точности исполнения. Растворы сахарозы разной концентрации позволяют выбрать один раствор, водный потенциал которого будет близок к водному потенциальну клеток растительной ткани. В этом растворе с наибольшей вероятностью будут сохраняться целые протопласти.

### **2.18 Лабораторная работа №18 (2 часа).**

## **Тема: «Контроль качества антибактериальных вакцин»**

**2.18.1 Цель работы:** дать характеристику вакцинам и рассмотреть критерии контроля качества вакцин

### **2.18.2 Задачи работы:**

1. Дать характеристику вакцин по следующим критериям:
  - цвет
  - наличие осадка, характер осадка, цвет, наличие примесей, хлопьев.
  - консистенция
  - наличие этикетки, укупорки
  - срок годности условия хранения
  - какая вакцина: живая, аттенуированная, депонированная, ассоциированная, поливалентная, культуральная.

### **2.18.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

#### **1. Вакцины**

### **2.17.4 Описание (ход) работы:**

Вакцина - биопрепарат, приготовленный из возбудителей инфекции, лишенных патогенных свойств, но сохранивших иммуногенные свойства. Введение вакцины в организм ведет к активации факторов иммунитета, в том числе и к образованию антител против того возбудителя, из которого приготовлена вакцина. Вакцина – биопрепарат, предназначенный для создания активного иммунитета.

Основоположником вакцинации считают английского врача Э.Дженнера – 1796 г. Работы Л.Пастера - 1885 г.

В настоящее время благодаря достижениям в области микробиологии. Вирусология, генетике, биохимии, молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии постоянно совершенствуются и создаются новые биологические препараты для профилактики инфекционных болезней.

Все вакцины в зависимости от биологической системы используемой для культивирования вакцинного штамма различают:

1) тканевые в своей основе содержат ткань животных, в которой размножался и накапливался вакцинный штамм:

- лапинизированные - полученные в организме кролика;
- капринизированные – козы;
- авинизированные – куриных эмбрионах;
- культуральные – из зараженных культур клеток.

2) В зависимости от видовой принадлежности вакцинного штамма:

- гомологические – готовят из того вида возбудителя против которого необходимо создать иммунитет. Большинство вакцин гомологические.

- гетерологические – готовят из возбудителей другого вида но имеющих в своем составе сходные антигены и обладающих перекрестной иммуногенностью. (например, вакцину против оспы кур готовят из вируса оспы голубей; вирус герпеса индеек используют для защиты кур от болезни Марека).

3) в зависимости от количества типов и видов возбудителей, включенных в состав вакцины, различают моновалентные, поливалентные, ассоциированные, смешанные вакцины.

Моновалентные – содержат антигены одного типа (вида) возбудителя.

Поливалентные (бивалентные, тривалентные и т.п.) – готовят из нескольких типов возбудителей. Например, тривалентная вакцина против вируса ящура содержит 3 типа вируса ящура- А.О.С.

Ассоциированные – содержат антигены возбудителей разных видов. Например, вакцина «Бивак» - против ИРТ и ПГ-З КРС., «Тетравак» - чумы, аденоэвироза, инфекционного гепатита и парвовирусного энтерита.

Смешанные – представляют собой смесь вирусных и бактериальных антигенов. Например, вакцина против чумы плотоядных, ботулизма и вирусного энтерита.

4) В зависимости от жизнеспособности возбудителя, входящего в состав вакцины, их подразделяют на живые, инактивированные.

- Живые вакцины содержат селекционированные ослабленные (аттенуированные) штаммы вируса.

- Инактивированные – содержат инактивированные (убитые) штаммы возбудителя. Инактивацию осуществляют физическими и химическими методами.

Все вирусные вакцины делят на цельновирионные и компонентные. К цельновирионным относятся как живые так и инактивированные вакцины. К компонентным можно отнести все вакцины которые не входят в рубрику цельновирионных т.е. сплит-вакцины, субъединичные, синтетические, генно-инженерные.

Основное требование к живым вакцинам это чтобы производство вакцин было экономически выгодным, а применение достаточно эффективным.

Любой вакцинныи штамм должен быть хорошо изучен, клонирован, паспортизирован и комиссионно сдан во Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов, где он хранится поддерживается и контролируется.

Так как свойства вакцин определяются вакцинным штаммом, то к ним предъявляются следующие требования:

1) Генетическая стабильность – способность сохранять свои свойства в различных условиях пассирования на восприимчивых животных, в системе культивирования, хранения ит.д., т.е. штамм не должен подвергаться реверсии.

2) Безвредность – вакцинныи штамм не должен вызывать клиническую картину болезни, вместе с тем должен «приживаться» размножаться в организме естественно-восприимчивых животных. Высокоиммуногенные штаммы приживаются в организме на 2-4 недель. При идеальном исходе аттенуации вирус должен практически утрачивать способность поражать клетки-мишени, но сохранять способность размножаться в других клетках, обеспечивая создание выраженного и напряженного иммунитета .

3) Допустимая степень реактогенности определяется по наличию местной и общей температурной реакции, общему состоянию..

4) Чистота живых и стерильность инактивированных вакцин определяется путем посева на питательных средах.

5) Антигенная активность определяют по наличию титра антител в сыворотке крови.

6) Иммуногенные свойства определяют при помощи теста активной защиты высокочувствительных животных.

7) Эпизоотическая и эпидемическая безопасность.

Т.о. технология изготовления живых вакцин сводится к

- культивированию вакцинного штамма в какой-либо биологической системе (животные, эмбрионы, культуры клеток);

- определению концентрации возбудителя (титра);

- контролю на стерильность;

- фасовке и лиофилизации (для сохранения биологической активности вируса перед лиофилизацией добавляют стабилизирующие вещества.)

- вакцина проходит контроль.

Если она соответствует всем критериям её этикетируют и впускают для применения.

Живую противовирусную вакцину называют вирусвакциной.

## 2.19 Лабораторная работа №19 (2 часа).

Тема: «Контроль качества антибактериальных вакцин»

**2.19.1 Цель работы:** оценить чистоту живых и стерильность инактивированных вакцин.

**2.19.2 Задачи работы:**

1. Дать характеристику вакцин по следующим критериям:
  - стерильность инактивированных вакцин
  - чистота живых вакцин.

**2.19.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Вакцины
2. Питательные среды для культивирования микроорганизмов

**2.19.4 Описание (ход) работы:**

С целью повышения качества и стандартности профилактических средств и диагностических препаратов является тщательное изучение стабильности производственных штаммов микроорганизмов и всех присущих им генетических признаков (маркеров), а у аттенуированных штаммов, предназначенных для изготовления живых вакцин, кроме того, эпизоотической и эпидемиологической безопасности, а также персистирования вакцинных штаммов в организме иммунизированных животных и взаимодействия между микро- и макроорганизмами.

При генетической характеристике производственных (вакцинных) и контрольных штаммов микроорганизмов учитывают разные признаки:

Р-признаки – вирулентность (степень патогенности) по отношению к животным разных видов;

TC-признак – способность вируса размножаться в культуре клеток и вызывать характерные цитопатические изменения;

HA-признак – способность вируса агглютинировать эритроциты животных разных видов;

*Ad-признак* – внутритиповая штаммовая антигенная специфичность;

*S-признак* – образование бляшек определенного размера и другие признаки.

Производные и контрольные штаммы микроорганизмов должны быть классифицированы, клонированы, и представлять собой однородную популяцию микроорганизмов, происходящих из одной клетки или вирусодержащей бляшки, с характерным для нее генетически закрепленными признаками:

Морфологическими – размер, форма, пигментация колоний;

Биохимическими – приобретение или утрата клетками способности использовать определенные аминокислоты, факторы роста, способность утилизировать углеводы.

Антигенными – утрата тех или иных антигенов,

Другие признаки, например, чувствительность к физическим, химическим факторам воздействия на микробную клетку (вирион) и т.д.

В популяции производственных и контрольных штаммов микроорганизмов допускают присутствие диссоциированных форм микроорганизмов в количестве, не превышающем 5% от общего числа клеток (вирионов), при условии, если они не влияют отрицательно на фенотипические свойства штамма.

Вакцинский штамм, предназначенный для изготовления живой вакцины, это естественно или искусственно аттенуированная культура микроорганизма, обладающая высокой иммуногенностью, вызывающая образование иммунитета не менее чем у 70% однократно иммунизированных животных.

Непременное требование – отсутствие реверсибельности всех вакцинных штаммов.

Обязательным требованием при иммунизации является отсутствие специфического инфекционного процесса или специфической интоксикации у подопытных животных после введения им массивных доз вакцинного штамма в 5 -10 и более раз превышающих профилактическую дозу вакцины.

*Стабильность свойств* (стойкость аттенуации) вакцинных штаммов определяют многократными (не менее пяти) последовательными пассажами через организм наиболее восприимчивых животных (в т.ч. лабораторных).

*Иммунизирующую дозу* культур вакцинных штаммов выражают количеством живых организмов, содержащихся в единице объема, причем она не должна быть чрезмерно большой или малой.

Вакцинныe штаммы вирусов должны иметь определенные титры активности (инфекционности) в конкретной биологической системе (эмбрионы птиц, культуры клеток и тканей, макроорганизмы). Каждый вакцинныe штамм должен иметь определенный срок возможного выведения из организма иммунизированных животных.

Допускается контагиозность отдельных вирусных штаммов, без признаков реверсии к их исходной форме.

Производные штаммы, используемые для изготовления инактивированных вакцин, анатоксинов и диагностикумов по антигенным и другим свойствам должны быть идентичными большинству циркулирующих в естественных условиях эпизоотических культур.

На все штаммы микроорганизмов, применяемых для изготовления и контроля биопрепаратов (вакцин, анатоксинов и диагностикумов) составляют паспорта.

В паспортах указывают лимиты вирулентности; сельскохозяйственных, промысловых и лабораторных животных, чувствительных к штаммам в естественных условиях; основные пути и методы заражения этих животных; продолжительность инкубационного периода, а также степень опасности для человека; дают подробную характеристику серологических свойств штаммов с указанием времени образования специфических антител у вакцинированных животных и титров их в РСК, РП, РА, РН, РНГА и других серологических реакциях.

Производственные, вакцинныe и контрольные штаммы хранят в высушенном состоянии при минусовых температурах. Также их поддерживают и хранят во ВГНКИ ветпрепаратов в виде эталонных образцов, используемых для производства и контроля соответствующих вакцин, анатоксинов и диагностикумов.

Дубликаты эталонных штаммов хранят в лиофильно высушенном состоянии в герметически запаянных ампулах в архивах отделов биологического контроля (ОБК) ВГНКИ ветпрепаратов МСХ России, на биопредприятиях.

Срок хранения архивных образцов производственных, вакцинных и контрольных штаммом устанавливают в каждом случае отдельно, но во всех случаях он должен быть не меньше пяти лет.

Основными показателями хорошего качества всех профилактических препаратов являются: чистота (отсутствие контаминаントов), безвредность, допустимая степень реактогенности, антигенная активность и иммуногенная эффективность, эпизоотическая и эпидемическая безопасность (особенно для живых вакцин против зооантропонозных болезней).

Все инактивированные препараты должны быть стерильными. Контроль на стерильность проводится с использованием различных питательных сред, которые обеспечивают надежное выявление аэробных и анаэробных бактерий, а также грибов и дрожжей. При выявлении бактерий препараты уничтожаются.