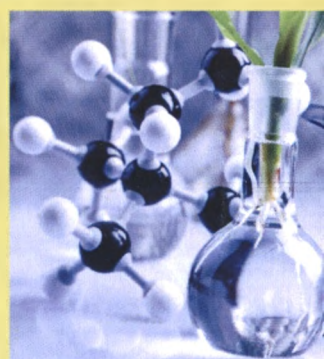


**Зноба Р. М.,  
Сегизбаева Г. Ж.,  
Арыстанова Ш. Е.,  
Гаджимурадова А. М.**



# **ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ**



**Турпанова Р. М., Сегизбаева Г. Ж.,  
Арыстанова Ш. Е., Гаджимурадова А. М.**

# **ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ**

*Учебно-методическое пособие для студентов  
специальности «Биотехнология»*



**Э В Е Р О**  
**Алматы 2020**

**УДК 60 (075)**  
**ББК 30.16. я 73**  
**О 29**

Рекомендовано к печати Ученым советом Евразийского национального университета им. Л. Н. Гумилева от 28 января 2016 г, протокол № 7

**РЕЦЕНЗЕНТЫ:**

**К. Н. Мукантаев** – доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией иммунохимии и иммунобиотехнологии РГП НЦБ РК, г. Астана;

**А. П. Науанова** – доктор биологических наук, профессор кафедры «Почвоведения и агрохимии» КазАТУ им. С. Сейфуллина, г. Астана;

**Ж. Ш. Ургалиев** – кандидат биологических наук, доцент кафедры «Биотехнологии и микробиологии» ЕНУ им. Л. Н. Гумилева.

Объекты биотехнологии: Учеб.-метод. пособие / Р. М. Турпанова, Г. Ж. Сегизбаева, Ш. Е. Арыстанова, А. М. Гаджимурадова. – Алматы: Эверо, 2020. – 420 с.

**ISBN 978-601-310-867-4**

В настоящем издании рассмотрены основные разделы изучаемого курса: биологические объекты, используемые в биотехнологии: бактерии, вирусы, грибы, водоросли, простейшие, особенности их строения и размножения, разнообразие и применение в биотехнологии. Отдельные темы посвящены культурам растительных и животных клеток, методам их культивирования, а также способам культивирования микроорганизмов. В заключительной части теоретического курса представлены прикладные аспекты применения биологических объектов в различных отраслях биотехнологии. В пособие также включены методические рекомендации по проведению практических и лабораторных работ по изучаемой дисциплине.

Учебно-методическое пособие адресуется студентам, изучающим дисциплину «Объекты биотехнологии».

**УДК 60 (075)**  
**ББК 30.16. я 73**

**ISBN 978-601-310-867-4**

© Турпанова Р. М.,  
Сегизбаева Г. Ж.,  
Арыстанова Ш. Е.,  
Гаджимурадова А. М., 2020  
© Эверо, 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список применяемых в тексте сокращений .....	9
Введение .....	10
<b>Тема 1. Введение в курс биотехнологии</b>	
Определение биотехнологии .....	11
История развития биотехнологии .....	15
<b>Тема 2. Биообъекты биотехнологии. Общая характеристика объектов биотехнологии</b>	
Понятие «биообъект» .....	23
Уровни организации живых систем .....	24
Общая характеристика объектов биотехнологии .....	27
<b>Тема 3. Микроорганизмы-прокариоты как объекты биотехнологии</b>	
Общая характеристика микроорганизмов .....	34
Строение бактериальной клетки .....	36
Морфология бактерий .....	38
Подвижность бактерий (жгутики) .....	39
Спорообразование .....	40
Химический состав бактерий .....	42
Метаболизм микроорганизмов .....	44
Питание бактерий .....	46
Поступление питательных веществ в клетку микроорганизма .....	51
Дыхание бактерий .....	53
Закономерности роста и размножения бактерий .....	55
Фазы развития бактериальной популяции .....	56
Синтез микробных пигментов, фосфоресцирующих и ароматических веществ .....	58
Систематика и номенклатура микроорганизмов .....	59
Микроорганизмы, отличающиеся от истинных бактерий .....	63
Области применения микроорганизмов-прокариот в биотехнологии .....	67
<b>Тема 4. Молочнокислые и уксуснокислые бактерии в биотехнологии</b>	
Общая характеристика молочнокислых и уксуснокислых бактерий .....	69
Классификация молочнокислых и уксуснокислых бактерий .....	71
Общая характеристика брожения .....	73
Химизм процесса брожения .....	74
Молочнокислое брожение .....	74

Спиртовое брожение .....	78
Маслянокислое брожение .....	80
Ацетонобутиловое брожение .....	81
Пропионовокислое брожение .....	82
Уксуснокислое брожение .....	84

### **Тема 5. Грибы как объекты биотехнологии**

Общая характеристика грибов .....	86
Размножение грибов .....	90
Систематика грибов .....	93
Царство Настоящих грибов .....	93
Грибы родов <i>Aspergillus</i> и <i>Penicillium</i> .....	96
Экологические группы грибов .....	97
Культивирование грибов .....	98
Значение грибов в природе и жизни человека .....	98
Использование грибов в биотехнологии .....	99
Вредная деятельность грибов .....	104

### **Тема 6. Водоросли как объекты биотехнологии**

Общая характеристика водорослей. Структура таллома .....	105
Строение клетки водорослей .....	111
Размножение водорослей .....	113
Экологические группировки водорослей .....	115
Особенности строения и жизнедеятельности водорослей .....	117
Значение водорослей в природе и жизни человека .....	119
Использование водорослей в биотехнологии .....	120
Технология получения белковой массы из клеток водорослей .....	123
Биотопливо из водорослей .....	124
Достижения биотопливной отрасли на основе водорослей .....	127

### **Тема 7. Простейшие как объекты биотехнологии**

Общая характеристика простейших .....	130
Типы питания и трофические органеллы .....	132
Органеллы выделения и осморегуляции .....	133
Ядерный аппарат .....	133
Типы размножения простейших .....	134
Жизненный цикл простейших .....	134
Классификация простейших .....	134
Значение простейших в природе и жизни человека .....	154
Использование простейших в биотехнологии .....	155

<b>Тема 8. Вирусы, бактериофаги, плазмиды как объекты биотехнологии</b>	
Общая характеристика вирусов .....	160
Морфология вирусов .....	160
Размножение вирусов .....	162
Культивирование и индикация вирусов .....	166
Бактериофаги .....	169
Морфология .....	169
Взаимодействие фага с бактериальной клеткой .....	171
Практическое использование фагов .....	173
Плазмиды .....	174
<b>Тема 9. Ферменты в биотехнологии</b> .....	180
Основные сведения о ферментах .....	180
Строение ферментов .....	181
Механизм действия ферментов .....	184
Номенклатура ферментов .....	191
Классификация ферментов .....	192
Области использования ферментов в биотехнологии .....	193
Иммобилизованные ферменты .....	198
Методы иммобилизации ферментов .....	201
Крупномасштабные производства с использованием иммобилизованных ферментов .....	206
<b>Тема 10. Культуры клеток, тканей и органов растений. Использование в биотехнологии</b>	
История культивирования клеток и тканей растений .....	212
Культура каллусных тканей .....	213
Основные характеристики каллусных культур .....	219
Методы выращивания культуры каллусных тканей .....	221
Культура протопластов .....	225
Способы получения протопластов .....	227
Способы культивирования протопластов .....	229
Суспензионные культуры .....	230
Способы выращивания суспензионной культуры .....	232
Области использования суспензионных культур .....	235
Области использования культуры растительных клеток и тканей в биотехнологии .....	237

<b>Тема 11. Культуры клеток животных</b>	
История культивирования животных тканей .....	239
Типы культур животных клеток.....	241
Методы культивирования животных клеток и тканей .....	245
Питательные среды для культивирования клеток животных .....	247
Системы культивирования клеток животных.....	249
Культивирование клеток и тканей беспозвоночных.....	254
Области применения культур клеток животных в биотехнологии.....	255
<b>Тема 12. Типовая схема и основные стадии биотехнологических производств</b>	
Основные стадии биотехнологического производства .....	260
Классификация продуктов биотехнологических производств .....	267
Примеры биотехнологических производств.....	267
Производство кормового лизина.....	267
Производство биогаза.....	268
<b>Тема 13. Культивирование микроорганизмов</b>	
Технология культивирования микроорганизмов .....	270
Методы ферментации .....	271
Биотехнологические штаммы микроорганизмов .....	283
<b>Тема 14. Использование биотехнологических процессов в различных отраслях народного хозяйства</b>	
Производство пищевых продуктов и напитков.....	286
Молочные продукты.....	286
Пробиотики.....	288
Хлеб .....	288
Продукты гидролиза крахмала .....	288
Производство алкогольных напитков .....	289
Биотехнологическое производство органических кислот.....	290
Биосинтез азотсодержащих веществ .....	291
Биотехнологическое производство белков .....	293
Получение и промышленное использование ферментов .....	295
<b>Тема 15. Современная биотехнология</b>	
Генная инженерия.....	299
Генетически модифицированные источники пищи.....	301
Трансгенные растения .....	303
Трансгенные животные .....	311

Клеточная инженерия .....	315
Биотехнологическое производство энергии .....	317
Инженерная энзимология .....	325
Сельскохозяйственная биотехнология.....	330
Экологическая биотехнология .....	331

### **Практические работы по курсу «Объекты биотехнологии»**

#### **Практическая работа №1.**

Техника работы с микроскопом. Микроскопирование.	
Техника работы с микробиологическими инструментами и лабораторной посудой .....	338

#### **Практическая работа № 2.**

Методы исследования микроорганизмов в живом состоянии .....	345
---	-----

#### **Практическая работа № 3.**

Приготовление фиксированных окрашенных препаратов. ....	348
---	-----

#### **Практическая работа № 4.**

Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов.....	355
---	-----

#### **Практическая работа № 5.**

Методы стерилизации питательных сред .....	360
--	-----

#### **Практическое занятие № 6.**

Получение уксусной кислоты.....	367
---------------------------------	-----

#### **Практическая работа № 7.**

Изучение морфологических и культуральных признаков микроскопических грибов и дрожжей.	
Приготовление препаратов «раздавленная капля». ....	369

#### **Практическая работа № 8.**

Водоросли .....	376
-----------------	-----

#### **Практическая работа № 9.**

Особенности строения простейших .....	378
---------------------------------------	-----

**Практическая работа № 10.**

Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений.....381

**Практическая работа № 11.**

Получение каллусов из листьев табака.....386

**Практическая работа № 12.**

Культивирование опухолевых клеток человека и линий эмбриональных фибробластов человека.....387

**Практическая работа № 13.**

Культивирование микроорганизмов .....390

**Практическая работа №14.**

Выделение из почвы микроорганизмов, продуцирующих гидролитические ферменты.....392

**Практическая работа № 15.**

Методы выделения и очистки целевого биотехнологического продукта .....396

**Список использованной литературы.....402**

**Словарь основных терминов.....405**

## СПИСОК ПРИМЕНЯЕМЫХ В ТЕКСТЕ СОКРАЩЕНИЙ

- АБК – абсцизовая кислота  
АТФ – аденозинтрифосфорная кислота  
БАВ – биологически активные вещества  
БАП – 6-бензиламинопурин  
БАВ – биологически активные вещества  
БАД – биологически активные добавки  
БВК – белково-витаминный концентрат  
В 5 – среда Гамборга-Эвеленга  
ГМИ – генетически модифицированные источники  
ГК – гибберелловая кислота  
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота  
ДАП – диаминопимелиновая кислота  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ИМК – индолилмасляная кислота  
ИУК –  $\beta$ -индолил-3-уксусная кислота  
НУК –  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота  
Кинетин – 6-фурфуриламинопурин  
ЛПС – липопротеиновый слой  
ПС – питательная среда  
В5 – питательная среда Гамборга  
А – питательная среда Андерсона  
МКБ – молочнокислые бактерии  
MS – питательная среда Мурасиге-Скуга  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ДАП – диаминопимелиновая кислота  
ЦПЭ или ЦПД – цитопатический эффект  
EPSPS – 5-енолпирувилщикимат-3-фосфатсинтаза  
ES – плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки.  
NEDO – New Energy and Industrial Technology Development Organization  
YAC – искусственные дрожжевые хромосомы

## ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Объекты биотехнологии» предназначена для университетов, ведущих подготовку студентов-бакалавров на основе кредитной технологии по специальности «5В070100 – Биотехнология».

Биологические объекты – центральный и обязательный элемент биотехнологического производства. Именно они создают его специфику. Объектами биотехнологии служат многочисленные представители групп живых организмов – микроорганизмы (вирусы, бактерии, протисты, дрожжи, микроводоросли, цианобактерии и др.), растения, животные, а также изолированные из них клетки и субклеточные структуры. В настоящем курсе подробно представлены структурно-морфологические особенности объектов биотехнологии (вирусов, бактерий, дрожжевых и мицелиальных грибов, фототрофных микроорганизмов, высших растений, животных).

Биотехнология базируется на протекающих в живых системах физиолого-биохимических процессах, в результате которых осуществляются выделение энергии, синтез и расщепление продуктов метаболизма, формирование химических и структурных компонентов клетки. В связи с этим в данном курсе представлены особенности осуществления обмена веществ и энергии в клетках эукариот и прокариот.

Курсом предусматривается изучение способов культивирования биообъектов, излагаются основные требования и принципы отбора биотехнологически значимых организмов, методы их хранения. Особое внимание уделяется таким объектам биотехнологии, как культуры клеток микроорганизмов, растений и животных. Рассматриваются прикладные аспекты применения биологических объектов.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов специальности биотехнология, а также исследователей, проявляющих интерес к современной биотехнологической науке.

Пособие состоит из двух частей. В теоретической части представлен лекционный материал по 15 темам, посвященный объектам биотехнологии; в конце каждой темы приведены контрольные вопросы. Вторая часть представляет собой практикум с лабораторными заданиями.

В основу пособия положены курсы лекций и практических занятий, которые проводились авторами в течение ряда лет в Евразийском национальном университете имени Л. Н. Гумилева, а также материалы авторов различных публикаций.

## ТЕМА 1. ВВЕДЕНИЕ В КУРС БИОТЕХНОЛОГИИ

### Определение биотехнологии

Термин «биотехнология» впервые был введен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки. Слово «биотехнология» происходит от греческих слов «bios» – жизнь, «teken» – искусство, «logos» – слово, учение, наука.

Данный термин применялся для описания крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы и до начала 1970-х гг. прошлого века использовался, в основном, в пищевой промышленности и сельском хозяйстве.



*Karl Ereky (1878–1952)*

По определению К. Эреки, биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты».

Однако этот термин в те годы не получил широкого распространения. Только в 1961 г. к нему вновь вернулись после того как шведский микробиолог Карл Герен Хеден порекомендовал изменить название научного издания «Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology» (Журнал микробиологической и химической инженерии и технологии), специализирующегося на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, на «Biotechnology and Bioengineering» (Биотехнология и биоинженерия). С этого момента биотехнология оказалась четко и необратимо связана с исследованиями в области промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов.

До 1970-х годов «биотехнологическими» называли производства, в которых применялись микроорганизмы (от промышленного пивоварения до выпуска антибиотиков). Согласно предложению Международного союза теоретической и прикладной химии (1981), биотехнология – это «практическое применение биохимии, микробиологии и химической технологии в промышленных процессах, создании новой продукции и защите окружающей среды».

В 1984 г. после долгих дебатов члены Европейской Ассоциации Биотехнологии согласились с тем, что «...Биотехнология – это научно-техническое направление, изучающее возможности использования биотехнологических процессов в технике и промышленном производстве». Также, по определению ЕАБ, «биотехнология базируется на интегральном использовании биохимии, микробиологии и инженерных наук в целях промышленной реализации способностей микроорганизмов, культур клеток тканей и их частей».

Понятие биотехнологии имеет большое количество определений, в том числе это:

- использование биологических объектов, систем или процессов для производства необходимых продуктов или для нужд сервисной индустрии;

- комплексное применение биохимических, микробиологических и инженерных знаний с целью промышленного использования потенциальных возможностей микроорганизмов, культур клеток и отдельных их компонентов или систем;

- использование биологических процессов в медицине, технике и промышленном производстве;

- технологическое использование биологических явлений для воспроизводства и получения (изготовления) различных типов полезных продуктов;

- приложение научных и инженерных принципов для обработки материалов биологическими агентами с целью получения необходимых продуктов или создания сервисных технологий;

- в традиционном понимании биотехнология – наука о методах и технологиях производства веществ и продуктов с использованием природных биологических объектов и процессов, направленной на производство лекарственных препаратов, ферментов, белков, красителей, ароматических веществ, витаминов и целого ряда биологически активных соединений, использовании биотехнологических методов в селекции и конструировании принципиально новых организмов, ранее не существовавших в природе;

– в современном понимании 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;

– следовательно, как это явствует из приведенных определений, биотехнология по существу сводится к использованию микроорганизмов, животных и растительных клеток или же их ферментов для синтеза, разрушения или трансформации (превращения) различных материалов с целью получения полезных продуктов для различных нужд человека.

Таким образом, биотехнология на самом деле не что иное, как название, данное набору технических приемов (подходов) и процессов, основанных на использовании для этих целей биологических объектов.

Биотехнология сформировалась на стыке таких наук, как микробиология, биохимия, молекулярная биология, генетика, органическая, аналитическая и неорганическая химия, также включает процессы и аппараты химической и пищевой промышленности и представляет собой мультидисциплинарное научно-практическое направление, основанное на биологических и инженерных подходах (рис. 1). Ее биологическая составляющая относится к сфере промышленной микробиологии и биохимии, а молекулярная – к областям молекулярной биологии, молекулярной генетики и энзимологии нуклеиновых кислот. Благодаря этому сочетанию стало возможным более детальное изучение внутриклеточных процессов клетки, систем наследования и экспрессии генов. Усовершенствование методов клеточной и молекулярной биотехнологии позволило управлять наследственностью и жизнедеятельностью животных, растений и микроорганизмов, создавать организмы с новыми полезными для человека свойствами, ранее не наблюдавшимися в природе.



Рисунок 1 – Взаимосвязь биотехнологии с другими науками

Преимущества производства органических продуктов биотехнологическими способами перед чисто химическими методами достаточно многогранны:

а) многие сложные органические молекулы, такие как белки и антибиотики, практически не могут быть синтезированы химическими способами;

б) биоконверсия обеспечивает значительно больший выход целевого продукта;

в) биологические системы функционируют при более низких температурах, менее высоких значениях рН (близких к нейтральному) и т. п.;

г) каталитические реакции биологических систем намного специфичнее, чем реакции химического катализа;

д) биологические процессы обеспечивают почти исключительно продукцию чистых изомеров одного типа, а не их смесей, как это часто бывает в реакциях химического синтеза;

е) биотехнологические направления имеют своей целью создание и практическое внедрение (т. е. практическое использование):

– новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов, используемых в здравоохранении для диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний;

– биологических средств защиты сельскохозяйственных растений от возбудителей заболеваний и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений и животных; новых сортов растений, устойчивых к разного рода неблагоприятным воздействиям (факторам внешней среды); новых пород животных с полезными свойствами (трансгенные животные);

– ценных кормовых добавок для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных (кормового белка, аминокислот, витаминов, ферментов, способствующих повышению усвояемости кормов и т.п.);

– новых биоинженерных методов для получения высокоэффективных препаратов различного назначения, используемых в сельском хозяйстве и ветеринарии;

– новых технологий создания и получения хозяйственно ценных продуктов для пищевой, химической и микробиологической промышленности;

– эффективных технологий переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов для получения продуктов, которые могут использоваться в других отраслях хозяйственной деятельности человека (например, биогаза, удобрений, топлива для автомобилей и т. п.).

Разумеется, такие комплексные задачи требуют интеграции различных отраслей научных и технических знаний и характеризуют биотехнологию как ряд перспективных технологий, которые найдут применение в самых разных направлениях индустрии. Интеграция биологии, химии и инженерных приемов в биотехнологии осуществляется таким путем, чтобы обеспечить максимальное использование потенциальных возможностей всех входящих в нее областей знаний. И все же, несмотря на комплексность биотехнологии, ее нельзя рассматривать как нечто единое целое. Скорее она должна рассматриваться как ряд перспективных технологий, сочетания которых будут постоянно варьировать в зависимости от конкретных практических задач.

### История развития биотехнологии

В истории развития биотехнологии можно выделить несколько периодов: эмпирический (допастеровский период), научно-практический (послепастеровский, эра антибиотиков), биотехнологический, молекулярный (или геннотехнический) и новейший (нанобиотехнологический).

*Эмпирический период (около 6 тыс. л. до н.э. – до 1856 г.).* Этот период характеризуется интуитивным поиском приемов и способов получения ценных веществ, например: использование спиртового брожения в производстве пива и вина, молочнокислого брожения – при переработке молока, уксуснокислого брожения – в производстве уксусной кислоты, получение хлебопекарных и пивных дрожжей. Во всех перечисленных процессах использовались биологические объекты (пусть даже без достаточных знаний о них), и все эти процессы на протяжении многих лет совершенствовались, правда, эмпирически. Начало этого эмпирического (от греч. «εμπειρικός» – опытный) или доисторического этапа биотехнологии теряется в глубине веков, и продолжался он примерно до конца XIX в.

Археологические раскопки доказывают, что ряд процессов биотехнологии зародились в древности. На территории древнейших очагов в Месопотамии, Египте сохранились остатки пекарен, пивоваренных заводов, сооруженных 4–6 тысячелетий назад.

В 3 тысячелетии до н. э. шумеры изготавливали около двух десятков сортов пива. В Древней Греции и Риме широкое распространение получили виноделие и изготовление сыра (рис. 2). В основе пивоварения и виноделия лежит деятельность дрожжевых грибков, а в сыроделии – молочнокислых бактерий и сычужного фермента. Получение льняного волокна происходит с разрушением пектиновых веществ микроскопическими грибами и бактериями. Иными словами, зарождение биотехноло-

гии тесно связано с сельским хозяйством, переработкой растенисводческой и животноводческой продукции.



**Рисунок 2** – Наскальные рисунки древних цивилизаций, отобразившие биотехнологические процессы

Работы великого французского ученого Луи Пастера (1822–1895) заложили фундамент практического использования достижений микробиологии и биохимии в традиционных биотехнологиях (пивоварение, виноделие, производство уксуса, консервация продуктов – пастеризация) и ознаменовали начало нового, научного **этиологического** (от греч. *aítia* – причина) **периода (1856–1933 гг.)** развития биотехнологии.

С аналитической микробиологией непосредственно связано открытие Пастером молекулярной асимметрии (стереоизомерии). Это, по существу, «бриллиантовый» век микробиологии. Пастер раскрыл микробную природу брожений, доказал возможность жизни в бескислородных условиях, экспериментально опроверг существовавшее тогда представление о самопроизвольном зарождении живых существ, создал научные основы вакцинопрофилактики и вакцинотерапии.



**Луи Пастер**

Немеркнущая слава Л. Пастера не затмила имен его выдающихся учеников и сотрудников: Э.Дюкло, Э.Ру, Ш.Э.Шамберлана, Ж.А.Вильмена, И. И. Мечникова. В этот же период творили Р. Кох, Д. Листер, Ш. Китазато, Г. Т. Риккетс, Д. И. Ивановский, А. Лаверан и другие.

В то же время, что и Л. Пастер, в Германии и затем во Франции проводил свои исследования выдающийся миколог А. де Бари (1831–1888) – основоположник микофитопатологии. Им разработана классификация, в основу которой легли результаты изучения стадий размножения и истории индивидуального развития грибов (онтогенетический метод), с учетом их взаимоотношений с другими видами, а также цитологических и биологических особенностей. И до настоящего времени на классификации де Бари основываются действующие классификационные схемы микро- и макромицетов. Кроме того, под его руководством сформировалась плеяда таких выдающихся ученых, как Ф. М. Бальфур, И. В. Баранецкий, М. Бейеринк, О. Брэфельд, М.С.Воронин, А. Кох, А. С. Фаминин и др.

В биотехнологии важнейшей проблемой является приготовление питательных сред для культивирования биообъектов. Л. Пастер приготовил первую жидкую питательную среду в 1859 году, метод выращивания грибов на желатине предложил О. Брэфельд в 1864 г., Ж. Ролен сообщил о жидких средах для выращивания нитчатых грибов в 1870 г., Р. Коху в 1876 г. удалось вырастить бациллы сибирской язвы в капле водянистой влаги, извлеченной из глаза погибшей коровы. В 80-е годы XIX столетия Р. Кох предложил метод культивирования бактерий на стерильных ломтиках картофеля и затем – на агаризованных питательных средах.

В настоящее время, разрабатывая самые сложные и необычные по составу питательные среды для выращивания биообъектов, исследователи опираются на основополагающие результаты этих выдающихся ученых. Аналогичным образом можно сказать и о различных вариантах способов стерилизации питательных сред, имея в виду тиндализацию, кипячение, дробную стерилизацию и др. Все они основываются на необходимости уничтожения посторонней микрофлоры, которая контаминирует (загрязняет) среды в процессе их изготовления.

В ряду открытий всемирного значения стоит обнаружение в 1892 г. вируса мозаичной болезни табака Д. И. Ивановским (1864–1920). Последовавшие за этим открытия других вирусов обеспечили становление новой научной дисциплины – вирусологии: Ф. Леффлер и П. Фрош в 1898 г. открыли вирус ящура, Д. Кэррол в 1901 г. – вирус желтой лихорадки, Ф. Туорт в 1915 г. и Ф. д'Эрелль в 1917 г. – вирусы бактерий (бактериофаги). Большой вклад в вирусологию был внесен русскими и зарубежными учеными – Л. А. Зильбером, А. Чумаковым, А. Борелем, К. Левадита, К. Ландштейнером, В. Стэнли, П. Лейдлоу, П. Руа, П. Ф. Эндерсом и многими другими.

**Этиологический период** знаменателен тем, что удалось доказать индивидуальность микробов и получить их в чистых культурах. Более того, каждый вид мог быть размножен на питательных средах и использован в целях воспроизведения соответствующих процессов (бродильных, окислительных и др.). Пионером использования чистых культур (заквасок) в производстве алкогольных напитков был шведский ученый Карл Хансен.

В начале XX века биохимиками и микробиологами была выяснена природа многих метаболических процессов в клетках, и эти открытия стали теоретической основой для создания первых промышленных производств. Наиболее важными из них были:

- открытис В. Оствальдом в 1893 г. каталитической функции ферментов;

- Т. Леб в 1897 г. установил способность к выживанию вне организма (в пробирках с плазмой или сывороткой крови) клеток крови и соединительной ткани;

- Г. Хаберланд в 1902 г. показал возможность культивирования клеток различных тканей растений в простых питательных растворах;

- Ц. Нейберг в 1912 г. раскрыл механизм процессов брожения;

- Л. Михаэлис и М. Л. Ментен в 1913 г. разработали кинетику ферментативных реакций;

— А. Каррель усовершенствовал способ выращивания тканей животных и человека и впервые применил экстракт эмбрионов для ускорения их роста.

В 1915 г. в Германии было налажено промышленное производство глицерина на основе модифицированного процесса спиртового брожения, а в 1916 г. в Великобритании микробиологическое производство ацетона и бутанола.

Г. А. Надсон и Г. С. Филлипов в 1925 г. доказали мутагенное действие рентгеновских лучей на дрожжи, а в 1937 г. Г. Кребс открыл цикл трикарбоновых кислот. В 1933 году А. Клюйвер и Л. Перкин опубликовали работу «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов», в которой изложили основные технические приемы, а также подходы к оценке и интерпретации получаемых результатов при глубинном культивировании грибов.

С этого времени начинается **третий период** в развитии биологической технологии — **биотехнический (1933–1972 гг.)**. Этот период связан с началом бурного развития биологических наук: генетики, микробиологии, вирусологии, цитологии, физиологии, эмбриологии.

На рубеже XIX и XX вв. в ряде стран создаются первые биогазовые установки, в которых отходы животноводства и растениеводства под действием микроорганизмов превращались в биогаз (метан) и удобрение.

В 20-ые годы XX века было налажено производство лимонной кислоты, некоторых витаминов, начаты работы по микробиологической трансформации стероидов, созданы крупные установки по биоочистке сточных вод. В конце 40-х годов XX века, с организацией крупномасштабного производства антибиотиков (пенициллин), стала развиваться микробиологическая промышленность. Антибиотики нашли широкое применение не только в медицине, но и в сельском хозяйстве для лечения животных и растений, а также в качестве биодобавок в корма.

Были созданы высокоэффективные формы мутантных штаммов микроорганизмов. Возникли предприятия, на которых с помощью микроорганизмов производились аминокислоты, витамины, органические кислоты, ферменты. В конце 60-х годов получила развитие технология иммобилизованных ферментов.

Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период становления и развития производства антибиотиков (время второй мировой войны 1939–1945 гг., когда возникла острая необходимость в противомикробных препаратах для лечения больных с инфицированными ранами). Все прогрессивное в области биологических и технических дисциплин, достигнутое к тому времени, нашло свое отражение в биотехнологии.

Накопленные научные данные стали побудительным мотивом для разработки способов крупномасштабного культивирования клеток различного происхождения. Это было необходимо для получения клеток и продуктов их жизнедеятельности для нужд человека и, прежде всего, в качестве или в составе лечебных и профилактических средств: пенициллина, стрептомицина, тетрациклинов, декстрана, ряда аминокислот и многих других веществ.

К 1950 г. Ж. Моно (Франция) разработал теоретические основы непрерывного управляемого культивирования микробов; в 50-е годы вопросам практической реализации непрерывного культивирования микроорганизмов посвятили свои исследования М. Стефенсон, И. Малек, Н. Д. Иерусалимский и др.

Примерно за 40 лет третьего периода были решены основные задачи по конструированию, созданию и внедрению в практику необходимого оборудования, в том числе главного из них – биореакторов.

Однако термин «биотехнология» в большей степени ассоциируется с новым, четвертым, **генотехническим (начиная с 1972 по настоящее время) периодом** развития этой науки, начало которому положено в 1973 г., когда Стэнли Коэн и Герберт Бойер получили рекомбинантные плазмиды и произвели трансформацию ими клеток *E. coli*. Этот период характеризуется развитием **генной инженерии**, которая позволяет целенаправленно изменять геном микроорганизмов, переносить в него свойства, заимствованные из растений и животных.

В 1982 г. получен коммерческий генноинженерный человеческий инсулин. Также были получены генноинженерные препараты: интерфероны, фактор некроза опухоли (TNF), интерлейкин-2, соматотропный гормон человека.

К основным достижениям, которые определили развитие генной инженерии, можно отнести следующие открытия:

- 1) доказательство в 1944 г. О. Эйвери (с соавторстве) роли ДНК как носителя генетической информации и открытие в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком структуры ДНК;
- 2) экспериментальное подтверждение универсальности генетического кода;
- 3) интенсивное развитие молекулярной генетики, объектами которой стали бактерии *Escherichia coli*, а также вирусы и плазмидные ДНК;
- 4) разработка методов выделения и очистки неповрежденных ДНК вирусов и плазмид, а также методов введения в клетки реципиента рекомбинантных ДНК, конструируемых *in vitro*, обеспечивающих репликацию и экспрессию кодируемых ими генов.

Для генотехнического периода характерно использование генетической и клеточной инженерии для получения новых продуцентов, полу-

чение моноклональных антител, гибридов и изолированных протопластов, трансплантация эмбрионов, разработка и внедрение экологически чистых и безотходных технологий, автоматизация и компьютеризация промышленного производства биотехнологической продукции.

Развитие биотехнологии в данный период революционизировало биологическую науку и дало мощный толчок развитию фармацевтической промышленности на основе рекомбинантных ДНК.

Появились «трансгенные» микроорганизмы, растения и животные, в которых осуществлялось целенаправленное конструирование генома.

**Пятый период** в развитии биотехнологии (начиная с 2000 года по настоящее время) ознаменовался развитием нанобиотехнологии, изучающей взаимодействие нанообъектов с живыми системами, получение наночастиц с использованием биореакторов и применение бионаноструктур для решения актуальных вопросов медицины, экологии, сельского хозяйства и других отраслей практической или теоретической деятельности.

Новые биотехнологии осуществили революционные перевороты, например: предотвратили деградацию лесов и обеспечили прогрессивное развитие лесного хозяйства, гарантировали перспективу горнодобывающей промышленности за счет извлечения металлов из бедных руд.

Без новейшей биотехнологии невозможны такие экологические важные процессы, как очистка стоков, ликвидация загрязнений от использования нефти и нефтепродуктов, рекультивация земель, отказ от применения в сельском хозяйстве химических удобрений и пестицидов.

В настоящее время наноматериалы используют для изготовления защитных и светопоглощающих покрытий, спортивного оборудования, транзисторов, светоспускающих диодов, топливных элементов, лекарств и медицинской аппаратуры, материалов для упаковки продуктов питания, косметики и одежды. Нанопрimesи на основе оксида церия уже сейчас добавляются в дизельное топливо, что позволяет на 4–5% повысить КПД двигателя и снизить степень загрязнения выхлопных газов.

Общемировые затраты на нанотехнологические проекты превышают \$9 млрд в год. На долю США приходится примерно треть всех мировых инвестиций в нанотехнологии. Другие главные игроки на этом поле – Европейский Союз и Япония. Исследования в этой сфере активно ведутся также в странах СНГ, Австралии, Канаде, Китае, Южной Корее, Израиле, Сингапуре, Бразилии и Тайване.

Таким образом, достижения биотехнологии перспективны в следующих отраслях:

– в промышленности (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая) – использование биосинтеза и биотрансформации новых

веществ на основе сконструированных методами генной инженерии штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами на основе микробиологического синтеза;

– в экологии – повышение эффективности экологизированной защиты растений, разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов агропромышленного комплекса, конструирование экосистем;

– в энергетике – применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза и моделированных фотосинтетических процессов, биоконверсии биомассы в биогаз;

– в сельском хозяйстве – разработка в области растениеводства трансгенных агрокультур, биологических средств защиты растений, бактериальных удобрений, микробиологических методов рекультивации почв; в области животноводства – создание эффективных кормовых препаратов из растительной, микробной биомассы и отходов сельского хозяйства, репродукция животных на основе эмбриогенетических методов;

– в медицине – разработка медицинских биопрепаратов, моноклональных антител, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии в направлении повышения чувствительности и специфичности иммуноанализа заболеваний инфекционной и неинфекционной природы.

### Контрольные вопросы:

- 1 Кем и когда был введен термин «биотехнология»?
- 2 Что изучает биотехнология?
- 3 Назовите основные этапы развития биотехнологии?
- 4 Что такое междисциплинарная область науки? Приведите примеры междисциплинарных наук.
- 5 Какой ученый установил, что процессы брожения имеют микробиологическую природу и каждый вид брожения обусловлен своим специфическим возбудителем?
- 6 Когда и кем было сделано открытие мутагенного действия рентгеновского излучения на микроорганизмы?

## ТЕМА 2. БИООБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ БИОТЕХНОЛОГИИ

### Понятие «биообъект»

Современное промышленное производство продуктов биосинтеза представляет собой единую биотехнологическую систему, которая складывается из последовательных стадий и операций, количество и особенности которых зависят от вида производимой продукции и ее товарной формы. Структура и особенности биотехнологии могут охватывать отдельные операции или процесс в целом.

Совершенствование биотехнологического процесса может привести к созданию новых структурных единиц и к ликвидации устаревших.

Определяющими факторами в данном случае являются:

- используемый биологический агент (объект);
- субстрат и его биохимические и биофизические характеристики;
- аппаратное оформление, включая системы контроля и управления;
- технологический режим или способ реализации;
- соответствие технологических процессов, оборудования, помещений, качества продукции требованиям стандартов.

Субстратом является питательная среда для культивирования клеток, продуктом – биомасса клеток, вирусов или синтезируемое клетками вещество, которому при соответствующей обработке придается товарный вид.

Одним из основных элементов аппаратного обеспечения биотехнологического процесса является биореактор (аппарат-культиватор, ферментер). При определенных параметрах и режимах культивирования в биореакторах можно выращивать практически любые клетки живых организмов.

Биообъект – центральный и обязательный элемент биотехнологического производства, создающий его специфику.

Биологическими объектами (агентами) биотехнологии являются различные представители живой природы, которые делятся на три надцарства: акариоты (безъядерные), прокариоты (предъядерные) и эукариоты (ядерные) и 5 царств: вирусы, бактерии, в том числе микроскопические водоросли, грибы, простейшие, растения и животные, клеточные и тканевые культуры растений и животных, а также многокомпонентные ферментные системы клеток, отдельные ферменты и биомолекулы.

В зависимости от вида биообъекта различают микробиотехнологию, фитобиотехнологию и зообиотехнологию. Современная биотехнология

является преимущественно микробиотехнологией, так как наиболее часто в качестве ее объектов применяются микроорганизмы. При определенных условиях они, как правило, легко размножаются в питательных средах. Относительная простота строения генетического аппарата и наличие плазмид у бактерий позволяет использовать их в генной инженерии.

Микроскопические грибы, характеризующиеся высоким разнообразием видов и форм, широко применяются для производства кормовых добавок, богатых белками и витаминами, а также для получения антибиотиков. В ряде стран из грибов получают белки пищевого назначения – микропротеины.

Интенсивно развивающаяся фитобиотехнология основана на культивировании каллусных тканей или клеток растений. В генной инженерии используют также протопласты – клетки растений, лишенные стенок. Растительные клетки служат источниками многих лекарственных препаратов и других биологически активных веществ.

Самостоятельной ветвью биотехнологии является зообиотехнология, в которой используются клетки животных и человека. Культивирование клеток животных – наиболее трудоемкий и сложный процесс. Тем не менее, в настоящее время разработаны способы промышленного получения противовирусного белка интерферона из лимфобластов человека и моноклональных антител. Они основаны на том, что клетки-гибридомы образуются при слиянии лимфобластов человека (опухольные клетки, способные к неограниченному росту) и моноклональных антител (которые вырабатывают лимфоциты). Именно такие гибридомы и способны синтезировать белок интерферон.

Эмбриональные ткани используются для репродукции вирусов и в производстве противовирусных вакцин. Клетки и ткани животных являются также источниками высокоэффективных иммуномодуляторов, применяющихся для коррекции нарушений иммунитета.

Большие надежды возлагаются на биотехнологию в решении наиболее актуальных проблем, имеющих жизненно большое значение для выживания всего человечества: производство пищевого белка и разработка новых способов получения энергии.

### **Уровни организации живых систем**

Уровни организации живых систем отражают соподчиненность, иерархичность структурной организации жизни; отличаются друг от друга сложностью организации системы (клетка устроена проще по сравнению с многоклеточным организмом или популяцией).

Уровень жизни – это форма и способ ее существования (вирус существует в виде молекулы ДНК или РНК, заключенной в белковую оболочку, однако свойства живой системы вирус проявляет, только попав в клетку другого организма, где он размножается).

Отбор биообъекта для целей биотехнологии идет как на всех уровнях организации живой материи, так и внутри отдельных ступеней иерархии (табл. 1).

**Таблица 1. Классификация биообъектов по уровням организации**

Уровни организации			
(Суб) Молекулярный	Клеточный / тканевой	Организменный	Популяционный
ДНК РНК Белки Вирусы	Культуры клеток и тканей растений, насекомых, животных человека	Микроорганизмы, нативные и трансгенные растения, животные	Сообщества микроорганизмов, водорослей и насекомых, ассоциации

**(Суб) Молекулярный уровень.** Любая живая система, как бы сложно она ни была организована, состоит из биологических макромолекул: нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов, а также других важных органических веществ. С этого уровня начинаются разнообразные процессы жизнедеятельности организма: обмен веществ и превращение энергии, передача наследственной информации и др.

К объектам молекулярного уровня, используемым в биотехнологии, относится следующее:

*ДНК (дезоксирибонуклеиновая) и РНК (рибонуклеиновая)* кислоты являются сложными органическими соединениями. Они могут находиться в ядре клетки, в цитоплазме, в ее органоидах (структурах, имеющих в цитоплазме). Нуклеиновые кислоты состоят из нуклеотидов, соединенных между собой в цепи в определенной последовательности. Главная функция нуклеиновых кислот – хранение и передача генетической информации.

*Гены (фрагменты нуклеиновых кислот)* – это участки молекул ДНК (высшие организмы) или РНК (вирусы). Гены состоят из нуклеотидов

(сложных органических соединений), соединенных между собой и составляющих каждую из цепей ДНК (РНК). Каждый ген включает сотни нуклеотидов и отвечает за синтез определенного белка. Контролируя образование белков, гены управляют всеми биохимическими реакциями организма и поэтому определяют его признаки.

*Рекомбинантные молекулы нуклеиновых кислот* – новые (искусственно созданные) последовательности нуклеиновых кислот, образованные путем встраивания в цепь чужеродных молекул ДНК.

*Плазмида* – кольцевая внехромосомная молекула ДНК, способная к автономной репликации, т.е. к самостоятельному удвоению.

*Вектор* – молекула ДНК, способная включать в себя чужеродную ДНК, проникать в клетку и передавать ей генетическую информацию, которую несет встроенный участок ДНК. Но передача генетической информации не является единственной функцией вектора, например, существуют векторы, обеспечивающие реализацию генетической информации и т.д.

*Белки* – высокомолекулярные органические соединения, состоящие из аминокислот и участвующие в построении клеток и тканей, являющиеся ферментами, гормонами, дыхательными пигментами (гемоглобин), транспортными белками, иммуноглобулинами и т.д.

*Вирусы* – ретровирусы, аденовирусы, вирус герпеса 1 типа HSV; вирус SV-40 и др.

**Клеточный и тканевой уровень.** Клетка – структурная и функциональная единица, а также единица развития всех живых организмов, обитающих на Земле. На клеточном уровне происходит передача информации и превращение веществ и энергии.

Биообъектами клеточного и тканевого уровня, используемых в биотехнологии являются: каллусы, клеточные суспензии, соматические гибриды растений, культуры клеток и тканей животных и человека: стволовые клетки, реконструированные зиготы, эмбриональные клетки, соматические гибриды.

**Организменный уровень** характерен для одноклеточных и многоклеточных биообъектов (растениям, грибам, животным, человеку и различным микроорганизмам). Элементарной единицей организменного уровня служит особь, которая рассматривается в развитии – от момента зарождения до прекращения существования – как живая система.

Биообъектами организменного уровня в биотехнологии служат нативные и трансгенные растения (растения с повышенной продуктивностью, устойчивые к насекомым-вредителям, вирусам, гербицидам, неблагоприятным условиям среды и т.д.), трансгенные животные (животные с улучшенными свойствами по накоплению биомассы, животные

устойчивые к болезням, животные способные к синтезу новых, не свойственных данному организму веществ).

**Популяционно-видовой** уровень объединяет особи, родственные между собой в популяции. Затем популяции группируются в виды и именно на этом уровне возникают новые свойства. В этой системе осуществляются элементарные эволюционные преобразования – процесс микроэволюции. Стратегией популяционно-видового уровня есть более полное использование возможностей природной среды обитания, в стремлении к возможно более длительному существованию, в сохранении свойств вида и самостоятельном развитии.

Биообъектами популяционного уровня являются сообщества микроорганизмов, водорослей и насекомых, ассоциации микроорганизмов.

Области применения биообъектов популяционного уровня в биотехнологии – ассоциации анаэробных бактерий (метанообразующие – *Methanobacterium*) и др. При выщелачивании металлов используют *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, для биоремедиации используется метаболический потенциал растений, грибов, насекомых и др. В биотехнологии используют ассоциации клеток высших растений с микроорганизмами для получения растений, способных к фиксации молекулярного азота. Большая часть азота в природе фиксируется симбиотическими азотфиксаторами. Они используют продукты фотосинтеза макросимбионта для покрытия энергетических затрат на фиксацию азота и передают связанный азот растению.

**Биогеоценотический** характеризуется тем, что популяции различных видов становятся основными структурными элементами. Биогеоценоз – совокупность организмов разных видов и различной сложности организации с факторами среды их обитания. В процессе совместного исторического развития организмов разных систематических групп образуются динамичные, устойчивые сообщества.

**Биосферный.** Биосфера – совокупность всех биогеоценозов, система, охватывающая все явления жизни на нашей планете. На этом уровне происходит круговорот веществ и превращение энергии, связанные с жизнедеятельностью всех живых организмов.

## Общая характеристика объектов биотехнологии

**Бактерии** представляют собой безъядерные, одноклеточные (как правило) организмы, размером 0,2–10,0 мкм и имеющие определенную форму (палочки, кокки, спиралевидные формы и т. д.). Внутреннее содержимое бактериальной клетки (цитоплазма) изолировано от внешней среды клеточной оболочкой, состоящей из тонкой мембраны и стенки,

на которую приходится до 20 % сухого вещества бактерий. Клеточная стенка имеет сложное строение и придает бактериальной клетке определенную форму. Исключение составляют микоплазмы, у которых нет клеточной стенки.

Бактерии отличаются чрезвычайным разнообразием по условиям обитания, приспособляемости, способам питания и биоэнергетическим процессам, а также по отношению к макроорганизмам – животным и растениям. Среди них выделяют наиболее древние формы (археобактерии), способные жить в экстремальных условиях. Так, для галобактерий, обнаруженных в морских солеварнях, оптимальной средой обитания является концентрированный раствор поваренной соли (3,5–5,0 моль/л).

Термоацидофильные бактерии способны жить в горячих источниках, на склонах вулканов и в терриконах угольных шахт при pH 1–3 и температурах 59–105 С.

Эубактерии являются более чувствительными к условиям окружающей среды. Многие из них способны паразитировать в многоклеточных организмах и вызывать болезни человека, животных и растений. Болезнетворные микроорганизмы называются патогенными.

Благодаря большому разнообразию бактерий, обладающих широким диапазоном биохимического состава и своеобразием протекающих в них реакций, бактерии наиболее часто служат биотехнологическими объектами. Все они способны синтезировать продукты или осуществлять реакции, которые могут быть полезны для биотехнологии. Из биомассы бактерий получают различные органические вещества, в частности, аминокислоты, разнообразные белковые вещества, в том числе ферменты.

Бактерии являются удобным объектом для генетических исследований, так как быстро размножаются и содержат плазмидную ДНК, способную включать в свой состав чужеродные фрагменты. Генетически модифицированные и иммобилизованные на носителях клетки бактерий используются в научно-исследовательских и промышленных целях. Наиболее изученной и широко применяемой в генноинженерных исследованиях клеткой является кишечная палочка, обитающая в толстом кишечнике человека. С использованием технологий рДНК получены рекомбинантные штаммы *E. coli*, продуцирующие интерфероны, инсулин, гормон роста, антигены вируса СПИДа.

Для получения вакцин и диагностических препаратов используют также патогенные микроорганизмы (брюшного тифа, коклюша, дифтерии, столбняка и др.).

**Вирусы** представляют собой бесклеточные частицы размером несколько нанометров и видны только в электронном микроскопе. Они яв-

ляются облигатными (т. е. обязательными) паразитами и могут размножаться только в клетках других организмов. Вне клеток вирусы существуют в виде вирионов, представляющих собой комплекс нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) с белком, которые связаны между собой нековалентными связями. Белковые молекулы, окружающие РНК или ДНК, создают оболочку вируса, называемую капсидом. По типу нуклеиновой кислоты вирусы делятся на РНК-содержащие (вирусы растений, а также вирусы, вызывающие грипп, бешенство, полиомиелит, СПИД и другие заболевания человека) и ДНК-содержащие (бактериофаги, некоторые вирусы человека и животных, например, герпеса, оспы). Наряду с типичными вирусами открыты вириды. Они представляют собой частицы, которые состоят из низкомолекулярных РНК (240–400 нуклеотидов), и не содержат капсидов.

**Грибы**, насчитывающие десятки тысяч видов, сочетают в себе черты клеток растений и животных. Они имеют клеточное ядро, как и растения – прочную клеточную стенку; аналогично клеткам животных они нуждаются в некоторых витаминах и способны синтезировать собственные животным полисахариды: хитин и гликоген. Наибольший интерес для биотехнологии представляют микроскопические грибы, к которым относятся дрожжи, плесневые грибы.

Актиномицеты главные продуценты антибиотиков: так *Streptomyces* используется для получения стрептомицина, эритромицина, тетрациклинов и др., *Micromonospora* – гентамицина, *Penicillium spp.* – пенициллина, *Fusarium spp.*, *Botrytis spp.*) для получения гиббереллинов и цитокининов и т.д.

**Дрожжи** – это похожие на бактерии простейшие одноклеточные растения, но они принадлежат к семейству грибов. Их клетки больше и сложнее, чем у бактерий. Дрожжи размножаются почкованием, образуя дрожжевые пучки. Дрожжи участвуют в процессах брожения, ферментации и разложения. Они выделяют ферменты, которые вызывают биохимические изменения в продукте. Дрожжи отличаются способностью преобразовать сахар в спирт и углекислоту. Дрожжи чувствительны к температуре окружающей среды, предпочитают умеренную температуру от 13 до 30°C. Скорость их размножения уменьшается в ответ на понижение температуры. Дрожжи не такие стойкие к неблагоприятным условиям, как бактерии, хотя они могут развиваться в кислой среде, в которой большинство бактерий не выживает.

Дрожжи широко используют в хлебопечении, пивоварении, виноделии, получении соков, питательных сред для выращивания бактерий и культур животных клеток, а также в молочной промышленности для получения ацидофиллина и др. Они используются также для получения

спиртов, органических кислот, антибиотиков, различных биологически активных веществ и кормового белка. Из 500 известных видов дрожжей используется только несколько видов – *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces uvarum*. Для получения спирта из молочной сыворотки используются дрожжи *Kluyveromyces fragilis*. При производстве кефира и кумыса применяют дрожжи рода *Torula*, *Candida* – источник белка и витаминов.

Микроорганизмы потребляют из окружающей среды вещества, растут, размножаются, выделяют жидкие и газообразные продукты метаболизма, тем самым реализуя те изменения в системе (накопление биомассы или продуктов метаболизма, потребление загрязняющих веществ), ради которых проводят процесс культивирования. Следовательно, микроорганизм можно рассматривать как центральный элемент биотехнологической системы, определяющий эффективность ее функционирования.

Самостоятельную группу организмов, представляющих собой симбиоз (сожительство) грибов с водорослями или с цианобактериями, составляют **лишайники**, которые являются перспективными источниками для получения ряда биологически активных веществ, с давних времен, используемых в медицине и фармакологии, их способность к азотфиксации в последнее время привлекает внимание ученых, а также разрабатывают технологии хлебопечения с использованием лишайников.

Ассоциации и сообщества микроорганизмов применяются как источники энергии (ассоциации анаэробных бактерий (метанообразующие – *Methanobacterium*) и др., при выщелачивание металлов: *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, биоремедиации).

В биотехнологии используют ассоциации клеток высших растений с микроорганизмами для получения растений, способных к фиксации молекулярного азота.

Большая часть азота в природе фиксируется симбиотическими азотфиксаторами. Они используют продукты фотосинтеза макросимбионта для покрытия энергетических затрат на фиксацию азота и передают связанный азот растению. Способность формировать азотфиксирующие симбиозы, однако приобрели в процессе эволюции только определенные виды растений и микроорганизмов.

**Растения** (около 500 000 видов) – эукариотические организмы. К ним относятся низшие (водоросли) и высшие (споровые, голо- и покрытосеменные) растения.

**Водоросли** отличаются от высших растений тем, что не имеют органов и тканей, а представляют собой слоевища, состоящие из недифференцированных (одинаковых) клеток. Как и другие растения, водоросли обладают способностью к фотосинтезу и богаты различными углевода-

ми и пигментами. Один из видов водорослей – морская капуста используется в пищу. Из водорослей добывают агар-агар и альгинаты – полисахариды, используемые для изготовления микробиологических сред и в пищевой промышленности. Весьма перспективны в этом отношении и культуры одноклеточных водорослей, в частности высокопродуктивных штаммов *poda Chlorella u Scenedesmus*. Их биомасса после соответствующей обработки используется в качестве добавки в рационы скота, а также в пищевых целях. Например, хлорелла содержит около 50 % белка, а люцерна – лишь 18 %. В целом в пересчете на 1 га хлорелла образует 20–30 т чистого белка, а люцерна – 2–3,5 т. Кроме того, хлорелла содержит 40 % углеводов, 7–10 % жиров, витамины А (в 20 раз больше), В<sub>2</sub>, К, РР и многие микроэлементы.

**Высшие растения** – многоклеточные организмы, имеющие специализированные органы (корни, стебли, листья). Они состоят из тканей, образованных дифференцированными клетками. Ткани различаются химическим составом, строением и выполняют различные функции: механические, покровные, выделительные, проводящие и другие. Особое значение для биотехнологии имеет одна из тканей растений, называемая меристемой. Клетки меристемы способны к делению, благодаря чему осуществляется рост, а также образование тканей и органов растений. Они не утрачивают способности делиться и после удаления из растения. При выращивании на специальных питательных средах меристемные клетки дают массу делящихся клеток – каллус, который можно длительно культивировать, получать из него новые растения или использовать для извлечения нужных веществ. Наиболее сложным, но, в то же время, и неизмеримо более эффективным, является выращивание отдельных растительных клеток в жидких средах (в суспензионных культурах). Благодаря способности растений улавливать световую энергию солнца и использовать ее в синтезе органических веществ, растения служат поставщиками питательных веществ для других организмов. Растения составляют большую часть биомассы Земли, поэтому производство и переработка растительного сырья для удовлетворения потребностей человека используется с древнейших времен, являясь богатейшими и незаменимыми источниками углеводов, липидов, витаминов и многих других биологически активных и лекарственных веществ. При этом до настоящего времени, несмотря на выдающиеся достижения биотехнологии, используются традиционные способы извлечения биогенных соединений: экстракция, перегонка, фильтрация. Однако все большую роль приобретают технологии получения биологически активных веществ из клеточных культур (биостимуляторы из женьшеня, противора-

ковое средство таксол из коры тиса и др.), а также производство продуктов из генетически модифицированных растений.

**Животные** бывают простейшими (одноклеточными) и высшими (многоклеточными). Как и растения они состоят из ядерных клеток. Среди простейших имеются паразиты и возбудители болезней высших животных и человека. Культивирование их на искусственных средах чрезвычайно затруднено. Однако некоторые простейшие выращиваются и используются для целей биоиндикации, в токсикологических исследованиях и для получения отдельных веществ.

**Клетки растений и животных.** Культуры растительных и животных клеток служат источником многих ценных веществ для человека.

Из культур тканей растений (ткани, изолированные из целого растения, и культивируемые в условиях *in vitro*) можно получать комплекс соединений, используемых в медицине (алкалоиды, противовоспалительные вещества, противолейкозные и противоопухолевые, противобактериальные, сердечные и почечные средства, ферменты, витамины, опиаты и др.), в сельском хозяйстве, химической и других отраслях промышленности.

Ткани высших животных являются источниками полноценного белка, липидных веществ и некоторых витаминов, необходимых для человека. Из органов и крови животных получают белковые препараты (альбумин, иммуноглобулины, ферменты), некоторые гормоны и биологически активные вещества. Поскольку сырье животного происхождения является наиболее дорогим, а выход конечных продуктов недостаточно высок, то в современных технологиях все чаще используются культуры клеток животных или человека, выращиваемых на искусственных средах (получение интерферона, моноклональных антител).

Животные клетки используют как для получения продукции, синтезируемой клетками, так и для выращивания в клетках вирусов с целью получения из них вакцин и диагностических препаратов.

Наиболее перспективным и экономичным способом производства биологически активных веществ является генная инженерия, позволяющая внедрить ген животного в клетку бактерии, которая начинает синтезировать нужное вещество. Так получают в настоящее время человеческий инсулин – гормон белковой природы, без которого невозможен нормальный обмен веществ, гормон роста и некоторые другие вещества.

### Контрольные вопросы:

- 1 Как вы понимаете термин «биообъект»?
- 2 Приведите примеры классификации биообъектов по уровням организации.
- 3 Приведите примеры области применения биообъектов различных уровней в биотехнологии.

### ТЕМА 3. МИКРООРГАНИЗМЫ-ПРОКАРИОТЫ КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

#### Общая характеристика микроорганизмов

Микроорганизмы не составляют однородной в систематическом отношении группы. Название это имеет собирательное значение, оно объединяет все живые существа, имеющие микроскопические размеры и слабую морфологическую дифференцировку.

Микроорганизмы – наиболее древняя форма организации жизни на Земле. По количеству они представляют собой самую значительную и самую разнообразную часть организмов, населяющих биосферу.

К микроорганизмам относят:

- 1) бактерии – одноклеточные микроорганизмы растительного происхождения, лишенные хлорофилла и не имеющие ядра;
- 2) вирусы – уникальные микроорганизмы, не имеющие клеточной структурной организации;
- 3) грибы – одноклеточные и многоклеточные микроорганизмы растительного происхождения, лишенные хлорофилла, но имеющие черты животной клетки, эукариоты;
- 4) простейшие;
- 5) микроводоросли.

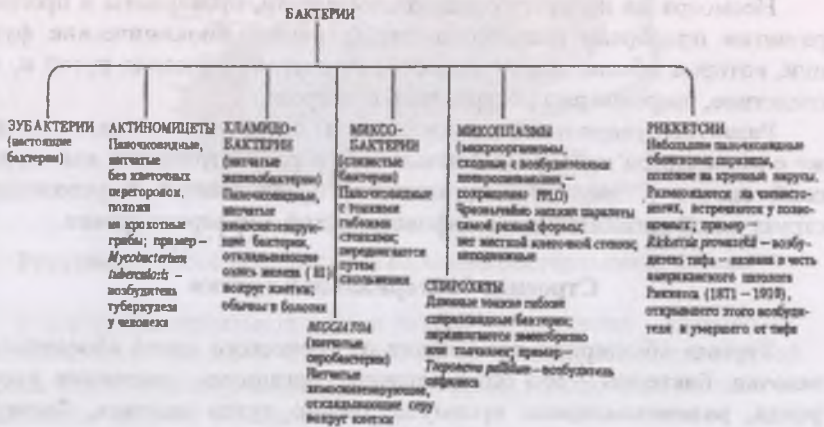
Термин «микробиология» происходит от греческих слов: «*micro*» – малый, «*bios*» – жизнь, «*logos*» – наука, т.е. наука о жизни малых.

Биологической единицей всего живого является клетка. Они построены по единому принципу. Важнейшими компонентами являются три типа макромолекул: ДНК, РНК и белок. Биосинтез органических веществ осуществляется сходным образом на любых ступенях организации. Все эти свойства объединяют разные организмы в единый мир живых существ. Однако наряду со сходством существуют и некоторые различия, позволяющие дифференцировать организмы на отдельные систематические группы. Изучение строения клеток с помощью электронного микроскопа выявило существенные различия в структуре клеток разных организмов.

Особенно большие различия установлены между бактериями и сине-зелеными водорослями, с одной стороны, и всеми остальными организмами (низшими и высшими) с другой. Это дало основание разделить живые существа на две противоположные группы: **прокариоты** (доядерные) и **эукариоты** (истинно ядерные).

К микроорганизмам прокариотам относятся (одноклеточные организмы, не содержащие оформленных ядер) – бактерии, актиномицеты,

рикетсии и низшие эукариоты (одноклеточные и многоклеточные организмы, имеющие сформированные ядра, в которых хромосомы окружены специальной пористой мембраной (липопротеидной природы), — дрожжи, нитчатые грибы, простейшие и водоросли.



К эукариотам отнесены высшие растения, животные и протисты (простейшие, водоросли и грибы), к прокариотам — бактерии и сине-зеленые водоросли.

Клетка эукариотов характеризуется сложным строением. Она имеет настоящее ядро с ядрышком, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной. В ядре содержится набор хромосом постоянный для каждого вида организмов. В цитоплазме клетки расположены важнейшие органеллы — митохондрии и хлоропласты, которые отделены от цитоплазмы мембраной (двойные). В митохондрии содержатся десятки ферментов, осуществляющих окислительно-восстановительные процессы. Хлоропласты содержат хлорофилл, участвующий в процессе фотосинтеза.

В клетках прокариотов отсутствует истинное ядро и ядерная мембрана, нет ядрышка. Ядерный аппарат представлен одной хромосомой, расположенной непосредственно в цитоплазме. Прокариоты лишены также митохондрий, хлоропластов и других органоидов, характерных для эукариотов. Они содержат функциональные аналоги этих органоидов, которые не всегда морфологически четко дифференцированы. Так, фотосинтетический аппарат сине-зеленых водорослей и фотосинтезирующих бактерий обнаруживается в форме относительно простых пластинчатых образований (хроматофор или тилакоидов).

Имеется существенная разница между этими двумя группами и в химическом составе клеточных стенок. Основным веществом клеточных стенок прокариотов является гликопептид или пептидогликан, не встречающийся в клетках эукариотов.

Несмотря на простоту организации клетки, прокариоты в процессе развития приобрели разносторонние физиолого-биохимические функции, которые обеспечивают многообразие метаболических путей и, как следствие, широкое распространение в природе.

Развитие эукариотов (из прокариотов) произошло значительно позже с появлением кислорода в атмосфере и рассматривается как гигантский скачок в эволюции организмов, проявившийся в усложнении структурной организации и морфологической дифференцировке.

### Строение бактериальной клетки

Термин «бактерии» происходит от греческого слова «*bacterion*» — палочка. Бактерии — это одноклеточные организмы, лишенные хлорофилла, размножающиеся преимущественно путем деления. Форму и размер бактерий изучают в убитом и живом состоянии при помощи микроскопии в окрашенных и неокрашенных препаратах. Размеры бактерий очень малы — от десятых долей микрометров до нескольких микрометров (мкм).

В среднем диаметр тела большинства бактерий 0,5–1 мкм, а средняя длина палочковидных бактерий 1–5 мкм. Встречаются бактерии, размеры которых значительно превышают среднюю величину; имеются и такие, величина которых находится на грани видимости в обычные оптические микроскопы (0,1–0,2 мкм).

Масса бактериальной клетки равна приблизительно  $4 \cdot 10^{-13}$  г.

Бактериальная клетка, несмотря на внешнюю простоту, представляет собой весьма сложный организм, для которого характерны процессы, свойственные всем живым существам (рис. 3).

Разные методы исследования позволили выявить различные поверхностные и внутренние структуры у бактерий. К поверхностным структурам относят капсулы, жгутики, фимбриии и пили, а также клеточная стенка, под которой расположена цитоплазматическая мембрана. К внутренним структурам относят цитоплазму, в которой находятся нуклеоид, рибосомы и мембранные образования, а также разнообразные включения. Бациллы и некоторые бактерии образуют споры.

Обязательными органоидами являются: ядерный аппарат, цитоплазма, цитоплазматическая мембрана.



**Рисунок 3** – Обобщенная схема строения бактериальной клетки

В центре бактериальной клетки находится **нуклеоид** – ядерное образование, представленное чаще всего одной хромосомой кольцевидной формы. Состоит из двухцепочечной нити ДНК. Нуклеоид не отделен от цитоплазмы ядерной мембраной.

**Цитоплазма** – сложная коллоидная система, содержащая различные включения метаболического происхождения (зерна волютина, гликогена, гранулы и др.), рибосомы и другие элементы белоксинтезирующей системы, плазмиды (вненуклеоидное ДНК), мезосомы (образуются в результате инвагинации цитоплазматической мембраны в цитоплазму, участвуют в энергетическом обмене, спорообразовании, формировании межклеточной перегородки при делении).

**Цитоплазматическая мембрана** ограничивает с наружной стороны цитоплазму, имеет трехслойное строение и выполняет ряд важнейших функций:

- барьерную (создает и поддерживает осмотическое давление);
- энергетическую (содержит многие ферментные системы: дыхательные, окислительно-восстановительные, осуществляет перенос электронов);
- транспортную (перенос различных веществ в клетку и из клетки).

**Клеточная стенка** присуща большинству бактерий (кроме микоплазм, ахлеплазм и некоторых других, не имеющих истинной клеточной стенки микроорганизмов). Она обладает рядом функций, прежде всего, обеспечивает механическую защиту и постоянную форму клеток, с ее наличием в значительной степени связаны антигенные свойства бактерий. В ее составе – два основных слоя, из которых наружный – более пластичный, внутренний – ригидный.

Капсула или слизистый слой окружает оболочку ряда бактерий. Выделяют микрокапсулу, выявляемую при электронной микроскопии в виде слоя микрофибрилл, и макрокапсулу, обнаруживаемую при световой микроскопии. Капсула является защитной структурой.

По строению и специфической реакции на красители в микробиологии различают грамотрицательные и грамположительные бактерии. Грамотрицательные бактерии имеют относительно тонкую клеточную стенку, которая состоит из пластичного (фосфолипиды, липополисахариды) и ригидного слоя, который образован пептидогликаном, чаще всего одним слоем. Грамположительные бактерии окружены единственным слоем фосфолипидной мембраны и обычно имеют толстый слой (20–80 нм) из пептидогликанов (мурейн). Оба этих вида клеточных стенок отличаются друг от друга по наличию или отсутствию внешней липидной мембраны.

К поверхностным структурам бактерий (необязательным, как и клеточная стенка), относятся **капсула, жгутики, микроворсинки**. Подвижные бактерии могут быть скользящие (передвигаются по твердой поверхности в результате волнообразных сокращений) или плавающие, передвигающиеся за счет нитевидных спирально изогнутых белковых (флагеллиновых по химическому составу) образований – жгутиков.

### Морфология бактерий

По форме бактерии разделяются на три основные группы: шаровидные, или кокковые, палочковидные и извитые (рис. 4)

*Шаровидные или кокковидные бактерии (кокки)* по характеру взаиморасположения после деления подразделяются на:

1) Микрококки. Клетки расположены в одиночку. Входят в состав нормальной микрофлоры, находятся во внешней среде.

2) Диплококки. Деление этих микроорганизмов происходит в одной плоскости, образуются пары клеток. Среди диплококков много патогенных микроорганизмов – гонококк, менингококк, пневмококк.

3) Стрептококки. Деление осуществляется в одной плоскости, размножающиеся клетки сохраняют связь (не расходятся), образуя цепочки. Много патогенных микроорганизмов – возбудители ангин, скарлатины, гнойных воспалительных процессов.

*Палочковидные формы микроорганизмов:*

4) Бактерии – палочки, не образующие спор.

5) Бациллы – аэробные спорообразующие микробы. Диаметр споры обычно не превышает размера («ширины») клетки (эндоспоры).

6) Клостридии – анаэробные спорообразующие микробы. Диаметр споры больше поперечника (диаметра) вегетативной клетки, в связи с чем клетка напоминает веретено или теннисную ракетку.

*Извитые формы микроорганизмов:*

7) Вибрионы и кампилобактерии имеют один изгиб, могут быть в форме запятой, короткого завитка.

8) Спириллы – имеют 2–3 завитка.

9) Спирохеты имеют различное число завитков, аксостиль – совокупность фибрилл, специфический для различных представителей характер движения и особенности строения (особенно концевых участков). Из большого числа спирохет наибольшее медицинское значение имеют представители трех родов – *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*.

ТОНКОСТЕННЫЕ, ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ		ТОЛСТОСТЕННЫЕ, ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ	
Менингококки		Пневмококки	
Гонококки		Стрептококки	
Вейлонеллы		Стафилококки	
Палочки		Палочки	
Вибрионы		Бациллы*	
Кампилобактерии, Хеликобактерии		Клостридии*	
Спириллы		Коринебактерии	
Спирохеты		Микобактерии	
Риккетсии		Бифидобактерии	
Хламидии		Актиномицеты	

Рисунок 4 – Классификация и морфология бактерий

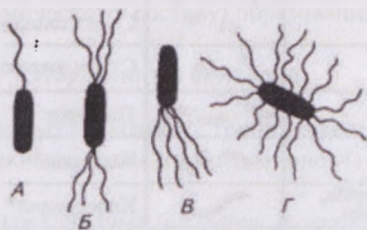
### Подвижность бактерий (жгутики)

Шаровидные бактерии, за редким исключением, не способны к передвижению. Среди палочковидных бактерий имеются подвижные и неподвижные формы. Изогнутые бактерии все подвижны.

Движение бактерий осуществляется обычно с помощью жгутиков, которые представляют собой спирально закрученные, тонкие белковой природы нити, способные сокращаться. Каждая нить, в свою очередь, состоит из нескольких тонких волоконцев, скрученных вместе. Жгутики некоторых бактерий достигают значительной длины, превосходящей в десятки раз и более длину клетки, но у большинства длина их 5–10 мкм, а толщина 0,01–0,03 мкм, т. е. ниже разрешающей способности светового микроскопа. Благодаря этому увидеть их можно только после специальных методов обработки или в электронный микроскоп.

Жгутики располагаются на поверхности тела бактерий либо поодиночке (монотрихальное жгутование), либо пучком (лофотрихальное жгутование) на одном или обоих концах клетки; они могут также находиться на всей поверхности клетки (перитрихальное жгутование) (рис. 5).

Характер и скорость движения неодинаковы у отдельных видов бактерий. Подвижность бактерий может быть утрачена под влиянием неблагоприятных условий жизни, при старении клеток. Жгутики легко отрываются при механических воздействиях.



**Рисунок 5** – Расположение жгутиков у бактерий:  
 А – монотрихи, Б – амфитрихи, В – лофотрихи, Г – перитрихи

### Спорообразование

Спорообразование происходит почти исключительно у палочковидных бактерий. В клетке бактерий образуется только одна спора. Спорообразование у бактерий не следует рассматривать как способ размножения. Споры – это покоящиеся клетки, обладающие устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды, служащие для сохранения вида. Спорообразование – процесс сложный и полностью еще не изученный. Он обычно наступает при обеднении среды питательными веществами или при накоплении в ней продуктов обмена. Перед спорообразованием в клетке накапливаются запасные питательные вещества (бел-

ки, липиды), образуется специфическое для спор вещество – дипиколиновая кислота (в вегетативных клетках она отсутствует). Эта кислота в виде кальциевой соли входит в состав оболочки зрелой споры.

Спора развивается из части протопласта (цитоплазмы с ядерным материалом) материнской вегетативной клетки. По мере развития и созревания споры закладываются ее оболочки, число и толщина которых варьируют у разных бактерий. Оболочки составляют значительную часть споры. Поверхность наружной оболочки может быть гладкой либо с выступами, с выступами. Процесс образования споры происходит в течение нескольких часов.

Обычно споры имеют круглую или овальную форму. Они располагаются в центре клетки, ближе к концу (субтерминально) и на самом конце (терминально). У одних видов бактерий расположение спор строго определенное, у других – строгой локализации не наблюдается.

Диаметр спор некоторых бактерий превышает ширину клетки, вследствие чего форма спороносящих клеток изменяется. Клетка приобретает форму веретена (кlostридиум), если спора расположена в ее центре, или форму барабанной палочки (плектридиум), когда спора находится на конце клетки.

После созревания споры материнская вегетативная клетка отмирает, оболочка ее разрушается и спора высвобождается. Зрелые споры под микроскопом имеют вид плотных блестящих телец, так как отличаются от вегетативных клеток большим светопреломлением. При обычном окрашивании бактерий споры не окрашиваются, потому что их оболочки малопроницаемы для краски.

Плотная оболочка, малое содержание свободной воды, наличие дипиколиновой кислоты создают большую устойчивость спор к физико-химическим воздействиям. Так, споры некоторых бактерий выдерживают кипячение в течение нескольких часов, могут длительное время сохраняться (десятки и сотни лет) в сухом состоянии, они значительно более стойки, чем вегетативные клетки, по отношению к действию химических ядов, радиации и других факторов внешней среды.

В благоприятных условиях споры прорастают в вегетативные клетки. При этом они набухают вследствие поглощения воды, активизируются их ферменты, усиливаются биохимические процессы, приводящие к росту. Затем происходит растворение или разрыв внешней оболочки, и через образовавшееся отверстие проросток (молодая бактериальная клетка) выходит наружу.

Скорость прорастания спор зависит от условий внешней среды; прорастание обычно длится несколько часов. Спорообразующие бактерии аэробные и факультативно-анаэробные называются бациллами, анаэробные – кlostридиями. Спорообразующие бактерии могут терять спо-

способность к спорообразованию и переходить в так называемые аспорогенные формы.

Помимо описанных истинных бактерий имеются и другие более или менее отличающиеся от них. Это нитчатые бактерии, слизистые (миксобактерии), спирохеты, актиномицеты, риккетсии, микоплазмы.

### **Химический состав бактерий**

Бактериальная клетка по своему химическому составу в общих чертах сходна с клетками всех живых организмов.

**Вода** – основная составная часть бактериальной клетки, которая составляет 75–90 %. Сухое вещество составляет 15–25 %.

Одна часть воды находится в свободном состоянии, другая часть – в связанном. Связанная вода является структурным растворителем. Свободная вода служит дисперсионной средой для коллоидов и растворителем для кристаллических веществ, источником водородных и гидроксильных ионов.

Ведущая роль принадлежит четырем органогенам – кислороду, водороду, углероду и азоту. Например, в процентном отношении к сухому веществу бактерии содержат: углерода – 45–55, азота – 8–15, кислорода – 30, водорода – 6–8 %. Соответственно дрожжи содержат (%): углерода – 49, азота – 12, кислорода – 31, водорода – 6. Эти органогены служат материалом, из которого построены все составные компоненты клетки: нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы, многочисленные ферментные системы и тому подобное.

**Белки** определяют важнейшие биологические свойства бактерий и состоят обычно из сочетаний 20 аминокислот. В состав бактерий входит диаминопимелиновая кислота (ДАП), отсутствующая в клетках человека и животных. Бактерии содержат более 2000 различных белков, находящихся в структурных компонентах и участвующих в процессах метаболизма. Большая часть белков обладает ферментативной активностью. Белки бактериальной клетки обуславливают антигенность и иммуногенность, вирулентность, видовую принадлежность бактерий. Белки составляют 50–80 % сухого вещества микробов. Различают два основных вида их: протеины и протеиды.

**Протеины**, или простые белки (альбумины, глобулины, гаптоны и др.), при гидролизе распадаются на аминокислоты (тирозин, лейцин, триптофан и др.). Они могут содержать углеводный или липидный компонент.

**Протеиды**, или сложные белки, – соединения простых белков (протеинов) с небелковыми группами, нуклеиновой кислотой, полисахари-

дами, жироподобными и другими веществами. Отсюда различают нуклеопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды и др.

**Нуклеиновые кислоты** представляют собой высокомолекулярные биологические полимеры, построенные из мононуклеотидов. Особенно характерно для них содержание фосфора (8–10 %) и азота (15–16 %), они также содержат углерод, кислород и водород. Содержание нуклеиновых кислот в бактериальной клетке может быть от 10 до 30 % сухого вещества, что зависит от вида бактерий и питательной среды. Нуклеиновые кислоты бактерий выполняют функции, аналогичные функциям нуклеиновых кислот эукариотических клеток: молекула ДНК в виде хромосомы отвечает за наследственность, рибонуклеиновые кислоты (информационная, или матричная, транспортная и рибосомная) участвуют в биосинтезе белка. Бактерии можно характеризовать (таксономически) по содержанию суммы гуанина и цитозина в молярных процентах от общего количества оснований ДНК. Более точной характеристикой микроорганизмов является гибридизация их ДНК. Основа метода гибридизации ДНК – способность денатурированной (однонитчатой) ДНК ренатурироваться, то есть соединяться с комплементарной нитью ДНК и образовывать двухцепочечную молекулу ДНК.

**Углеводы** бактерий представлены многоатомными спиртами (сорбит, маннит, дульцит); полисахаридами (гликоген, декстрин), моносахаридами (глюкоза, глюкуроновая кислота и комплексными соединениями). Полисахариды часто входят в состав капсул. Некоторые внутриклеточные полисахариды (крахмал, гликоген и др.) являются запасными питательными веществами. В бактериях содержится углеводов 12–18 % от сухого вещества. Углеводы выполняют энергетическую роль в микробной клетке.

**Липиды** в основном входят в состав цитоплазматической мембраны и ее производных, а также клеточной стенки бактерий, например наружной мембраны, где, кроме бимолекулярного слоя липидов, имеется ЛПС. Липиды бактерий представлены фосфолипидами, жирными кислотами и глицеридами. Наибольшее количество липидов (до 40 %) содержат микобактерии туберкулеза. Липиды играют роль резервных веществ, и в ряде случаев могут быть использованы как исходные компоненты для синтеза белков. С ними связана кислотоустойчивость микобактерий. Они же существенно влияют на проницаемость клеточных мембран, формируют систему пограничных мембран, выполняющих различные функции по обеспечению метаболизма микробной клетки.

**Ферменты** – глобулярные белки. Питание и дыхание в микробной клетке происходит с участием ферментов (энзимов), которые являются биологическими катализаторами, т. е. веществами, влияющими на ско-

рость химических реакций, из которых складывается метаболизм микроорганизмов.

Ферменты вырабатываются клетками и способны действовать, даже будучи выделенными из нее, что имеет большое практическое значение.

Принято различать экзо- и эндоферменты. Экзоферменты не связаны со структурой протоплазмы, легко выделяются в субстрат при жизни микробной клетки (гидролитические ферменты), растворимы в питательной среде и проходят через бактериальные фильтры. Эндоферменты прочно связаны с бактериальной клеткой и действуют только внутриклеточно, осуществляя дальнейшее разложение питательных веществ и превращение их в составные части клетки.

Большое число разнообразных ферментов, синтезируемых клетками микроорганизмов, позволяет использовать их в промышленном производстве для приготовления уксусной, молочной, щавелевой, лимонной кислот, молочных продуктов (сыр, ацидофилин, кумыс), в виноделии, пивоварении, силосовании.

**Минеральные вещества.** Кроме органогенов в микробных клетках находятся зольные элементы – минеральные вещества, составляющие от 3 до 10 % сухого вещества микроорганизмов. Среди них преимущественное значение имеет фосфор, который входит в состав нуклеиновых кислот, липидов, фосфолипидов. Сера содержится в аминокислотах, например в цистине и цистеине. Магний обеспечивает активность ряда ферментов, например протеазы. Микробы без магния не способны проявлять протеолитические свойства. Железо является необходимым элементом для осуществления процессов дыхания и энергетического обмена. Микроэлементы: молибден, кобальт, бор, марганец, цинк, медь, никель стимулируют процессы роста и размножения.

## Метаболизм микроорганизмов

Все реакции жизнеобеспечения, происходящие в микробной клетке и катализируемые ферментами, составляют **обмен веществ, или метаболизм.**

Клеточный метаболизм складывается из двух потоков реакций, имеющих разную направленность: энергетического и конструктивного метаболизмов.

**Конструктивный метаболизм** (биосинтез, анаболизм) – цепь последовательных реакций, в результате которых за счет поступающих извне веществ строится вещество клеток; это процесс, связанный с потреблением свободной энергии, запасенной в химической форме в молекулах АТФ или других богатых энергией соединениях.

Метаболические пути конструктивной и энергетической направленности состоят из множества последовательных ферментативных реакций и могут быть разделены на три этапа:

1) На начальном этапе воздействию подвергаются молекулы, служащие исходными субстратами. Иногда эту часть метаболического пути называют периферическим метаболизмом, а ферменты, катализирующие первые этапы превращения субстрата, – периферическими;

2) Последующие превращения включают ряд ферментативных реакций и приводят к образованию промежуточных продуктов, или метаболитов, а сама цепь превращений объединяется под названием промежуточного метаболизма;

3) На последних этапах образуются конечные продукты конструктивных путей, которые используются для построения вещества клеток, а конечные продукты энергетических путей выделяются в окружающую среду.

Конструктивные и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. У большинства прокариот они тесно связаны между собой. Однако у некоторых прокариотных организмов можно выделить последовательности реакций, служащих только для получения энергии или только для биосинтеза. Связь между конструктивными и энергетическими процессами прокариот осуществляется по нескольким каналам.

Основной из них – энергетический. Определенные реакции поставляют энергию, необходимую для биосинтеза и других клеточных энергозависимых функций. Биосинтетические реакции, кроме энергии, нуждаются часто в поступлении извне восстановителя в виде водорода (электронов), источником которого служат также реакции энергетического метаболизма. И наконец, тесная связь между энергетическими и конструктивными процессами проявляется в том, что определенные промежуточные этапы и метаболиты обоих путей могут быть одинаковыми (хотя направленность потоков реакций, относящихся к каждому из путей, различна). Это создает возможности для использования общих промежуточных продуктов в каждом из метаболических путей. Промежуточные соединения такой природы предложено называть амфиболитами, а промежуточные реакции, одинаковые для обоих потоков, – амфиболическими.

Метаболизм прокариот отличается необычайным разнообразием, которое есть результат способности этих форм жизни использовать в качестве источников энергии и исходных субстратов для построения веществ тела самый широкий набор органических и неорганических соединений. Такая способность обусловлена различиями в наборе клеточных периферических ферментов, воздействующих на исходные субстра-

ты и видоизменяющих их молекулы в направлении, позволяющем им далее метаболизироваться по каналам промежуточного метаболизма. Промежуточный метаболизм прокариот не отличается существенным разнообразием от периферического метаболизма эукариот, хотя по сравнению с ним состоит из большего числа вариантов.

Мономеры, необходимые для построения основных клеточных компонентов, могут быть синтезированы клеткой или поступать в готовом виде из среды. Чем больше готовых соединений должен получать организм извне, тем ниже уровень его биосинтетических способностей, так как химическая организация всех свободноживущих форм одинакова.

Основные типы метаболизма микроорганизмов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Основные типы метаболизма микроорганизмов

Тип метаболизма	Источник энергии	источник углерода	Тип питания
Дыхательный	Органическое вещество Неорганическое вещество	Органическое вещество, $\text{CO}_2$	Органотрофы, автотрофы
Бродильный	Органическое вещество	Органическое вещество	Хемоорганотрофы
Метаногенный	Органическое вещество, Неорганическое вещество, $\text{H}_2$	Органическое вещество, $\text{CO}_2$	Органотрофы, автотрофы
Фототрофный	Солнечная радиация	Органическое вещество, $\text{CO}_2$	Фотоорганотрофы, Фотоавтотрофы

### Питание бактерий

Питание является неотъемлемой функцией каждого живого организма. В процессе питания организм получает вещества, идущие на синтез клеточных структур, а также служащие источником энергии для всех процессов жизнедеятельности. Для питания микроорганизмов необходимы те же элементы, что для растений и животных. В первую очередь это углерод, азот, кислород и водород. Они являются основой всех органических веществ, которые входят в состав живой клетки.

Особенности питания бактериальной клетки состоят в поступлении питательных субстратов внутрь через всю ее поверхность, а также в высокой скорости процессов метаболизма и адаптации к меняющимся условиям окружающей среды.

Микроорганизмы в отличие от растений и животных характеризуются многообразием типов питания. Для них предложена новая классификация и новые термины для обозначения типов питания. В основу этой классификации положены источник углерода, источник энергии и донор электронов (восстановитель). Источником углерода для одних микроорганизмов могут служить неорганические соединения, в частности углекислота, для других органические вещества.

В конструктивном метаболизме основная роль принадлежит углероду, поскольку все соединения, из которых построены живые организмы, — это соединения углерода. Их известно около миллиона. Прокариоты способны воздействовать на любое известное углеродное соединение, то есть использовать его в своем метаболизме.

В зависимости от источника углерода для конструктивного метаболизма все прокариоты делятся на две группы: **автотрофы**, к которым принадлежат организмы, способные синтезировать все компоненты клетки из углекислоты (автотрофными бактериями являются нитрифицирующие бактерии, находящиеся в почве; серобактерии, обитающие в воде с сероводородом; железобактерии, живущие в воде с закисным железом, и др.) и гетеротрофы, для которых источником углерода служат органические соединения.

Понятия «авто-» и «гетеротрофия» характеризуют, таким образом, тип конструктивного метаболизма. Если автотрофия — довольно четкое и узкое понятие, то гетеротрофия — понятие весьма широкое и объединяет организмы, резко различающиеся своими потребностями в питательных веществах.

Наибольшая степень гетеротрофности присуща прокариотам, относящимся к **облигатным внутриклеточным паразитам** (от греч. «*parasitos*» — нахлебник), то есть организмам, которые могут жить только внутри других живых клеток, например, риккетсии, вирусы и некоторые простейшие. Они являются патогенными для растений, животных и человека. Паразитический образ жизни привел к редукции некоторых метаболических путей у этих прокариот, что и обусловило полную их зависимость от метаболизма клетки хозяина.

**Факультативными паразитами** (или условно-патогенными) называют формы прокариот, способные расти при создании подходящих условий вне клетки хозяина.

Следующую крупную группу прокариот составляют гетеротрофы, утилизирующие органические остатки отмерших организмов в окружающей среде, их называют *сапрофитами*.

Термин «сапрофит» происходит от греческих слов «*sapros*» – гнилой и «*phyton*» – растение. Сапрофиты используют продукты жизнедеятельности других организмов или разлагающиеся растительные и животные ткани. К сапрофитам относится большая часть бактерий. Степень требовательности к субстрату у сапрофитов весьма различна. В эту группу входят организмы, которые могут расти только на достаточно сложных субстратах (молоко, трупы животных, гниющие растительные остатки), то есть им нужны в качестве обязательных элементов питания углеводы, органические формы азота в виде набора аминокислот, пептидов, белков, все или часть витаминов, нуклеотиды или готовые компоненты, необходимые для синтеза последних (азотистые основания, пятиуглеродные сахара). Чтобы удовлетворить потребность этих гетеротрофов в элементах питания, их обычно культивируют на средах, содержащих мясные гидролизаты, автолизаты дрожжей, растительные экстракты, молочную сыворотку.

Есть прокариоты, требующие для роста весьма ограниченное число готовых органических соединений в основном из числа витаминов и аминокислот, которые они не в состоянии синтезировать сами, и, наконец, гетеротрофы, нуждающиеся только в одном органическом источнике углерода. Им может быть какой-либо сахар, спирт, кислота или другое углеродсодержащее соединение. Так, бактерии из рода *Pseudomonas* способны использовать в качестве источника углерода и энергии любое органическое соединение, и есть бактерии, для которых таким источником может служить узкий круг довольно экзотических органических веществ. Например, *Bacillus fastidiosus* может использовать только мочевую кислоту и продукты ее деградации, а некоторые представители рода *Clostridium* растут только в среде, содержащей пурины, другие органические субстраты для роста использовать они не могут. Биосинтетические способности этих организмов развиты в такой степени, что они сами могут синтезировать все необходимые им углеродные соединения.

Особую группу гетеротрофных прокариот, обитающих в водоемах, составляют *олиготрофные бактерии*, способные расти при низких концентрациях в среде органических веществ. Организмы, предпочитающие высокие концентрации питательных веществ, относят к *копиотрофам*. Термины происходят от греческих слов «*oligos*» – малый, «*copiosus*» – изобилие и «*trophe*» – пища. Если у типичных копиотрофов оптимальные условия для роста создаются при содержании в среде питательных веществ в количестве примерно 10 г/л, то для олиготрофных

организмов – в пределах 1–15 мг /л. В средах с более высоким содержанием органических веществ такие бактерии, как правило, расти не могут и погибают. Различия между гетеротрофными прокариотами с высокими потребностями в готовых органических соединениях и теми, потребности которых минимальны и сводятся, как правило, к одному какому-нибудь органическому источнику углерода, заключаются в степени развития их биосинтетических способностей. Крайняя степень развития биосинтетических способностей – возможность строить все клеточные компоненты из углекислоты – присуща группе автотрофных прокариот.

Как можно видеть из изложенного выше, в мире прокариот не существует резкой границы между авто- и гетеротрофными организмами, так же как нет ее в ряду одноуглеродных соединений ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{НСООН}$ ,  $\text{НСНО}$ ,  $\text{СНЗОН}$ ,  $\text{СН}_4$ ), каждое из которых может служить источником углерода для определенной группы прокариот.

Однако использование термина «автотрофия» удобно для обозначения конкретного типа конструктивного метаболизма, поскольку в процессе эволюции он оказался специфически связанным с определенными видами энергетических процессов, что привело к появлению у прокариот таких типов жизни, которые отсутствуют у более высокоорганизованных форм.

В зависимости от окисляемого субстрата, называемого донором электронов или водорода, микроорганизмы делятся на две группы: **литотрофы** (от греч. «lithos» – камень), использующие в качестве доноров водорода неорганические соединения, и **органотрофы**, использующие органические соединения.

Учитывая источник энергии, среди бактерий различают **фототрофы**, то есть фотосинтезирующие (например, сине-зеленые водоросли, использующие энергию света), и **хемотрофы**, нуждающиеся в химических источниках энергии.

Важным классификационным признаком для микроорганизмов по типу питания является отношение к использованию молекулярного кислорода.

Организмы, не способные расти в отсутствие кислорода, называют **аэробами**, способные к бескислородному существованию – **анаэробами**.

Облигатные аэробы (анаэробы) растут только в присутствии (отсутствии) кислорода.

Факультативные аэробы (анаэробы) могут расти как в тех, так и в других условиях.

Микроаэрофилы – облигатные аэробы, предпочитающие более низкие парциальные давления кислорода, чем в воздухе (например, микроорганизмы, получающие энергию путем окисления молекулярного во-

дорода: гидрогеназа – фермент, катализирующий эту реакцию, инактивируется кислородом)

Изучение химического состава бактериальной клетки показали, что основные органические соединения (белки, липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и др.) характерны для микроорганизмов всех типов. Они синтезируются клетками из веществ той среды, где развивается микроорганизм. Такие вещества, в которых нуждается микроорганизм и которые он потребляет из окружающей среды для удовлетворения своих пищевых потребностей, получили название питательных, а среды, содержащие их – питательных сред. Состав питательных сред определяется пищевыми потребностями микроорганизмов. Последние весьма разнообразны, поэтому и разнообразен набор питательных сред, применяемых для культивирования микроорганизмов. Универсальных сред нет. Для каждого вида или группы близких видов необходима своя среда. Среды, предназначенные для развития отдельных видов микроорганизмов, называются **элективными**, или избирательными. По происхождению среды бывают **естественными**, или натуральными, и **синтетическими** (лабораторными). Естественные среды состоят из веществ растительного и животного происхождения. Это могут быть клетки и ткани (культура тканей) или экстракты из них. На таких средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в них содержатся в основном все необходимые компоненты. Синтетические среды готовятся из химически чистых элементов, которые берутся в строго определенных концентрациях. Состав этих сред в отличие от естественных всегда известен.

Микроорганизмы отличаются от всех других организмов огромной скоростью потребления питательных веществ. Экспериментальным путем установлено, что бактериальная клетка за сутки потребляет «пищи» в 20 раз больше веса своего тела. Это свидетельствует о повышенном обмене веществ у микроорганизмов. Специальных органов питания микроорганизмы не имеют. Питательные вещества поступают в клетку через всю ее поверхность. Это способствует быстрому обмену веществ между клеткой и средой. Известны два способа питания живых существ – **голозойный и голофитный**.

При голозойном способе питания плотные частицы пищи захватывает или заглатывает живой организм, в пищеварительном тракте которого пища подвергается перевариванию. Этот способ питания характерен для животных (от высших до простейших).

При голофитном способе питания живые существа, не имеющие специальных органов для заглатывания и пищеварения, используют питательные вещества путем их всасывания в виде относительно небольших молекул из водного раствора.

Как известно, большинство органических соединений представляют собой полимеры (например, полисахариды и белки) и не могут быть поглощены и использованы непосредственно в обмене веществ клетки. Такие вещества вначале должны быть расщеплены на простые соединения, для которых клеточная мембрана проницаема. Крупные молекулы расщепляются экзоферментами, которые экскретируются клетками микроорганизмов в среду. Это так называемое внешнее, или внеклеточное переваривание, свойственное только микроорганизмам.

### Поступление питательных веществ в клетку микроорганизма

Поступление воды и растворенных в ней питательных веществ из окружающей среды внутрь микробной клетки, а также выход продуктов обмена из клетки происходит через клеточную стенку, капсулу и слизистые слои. Капсула и слизистые слои представляют собой достаточно рыхлые образования, и они, возможно, не оказывают значительного влияния на транспорт веществ, тогда как клеточная стенка может служить существенным барьером для поступления питательных соединений в клетку.

Активная роль в процессе поступления в клетку питательных веществ принадлежит также цитоплазматической мембране. Считают, что растворенное вещество может пройти через цитоплазматическую мембрану лишь тогда, когда на нее действует какая-либо сила или же с помощью механизмов, которые обуславливают перенос этого вещества через мембрану. В первом случае мы имеем дело с пассивной диффузией, когда транспорт вещества осуществляется через мембрану под действием разности концентраций (в случае не электролитов) или электрических потенциалов (в случае ионов) по обе стороны цитоплазматической мембраны. Экспериментально доказано, что за исключением воды, только некоторые вещества проходят через цитоплазматическую мембрану путем пассивной диффузии. Скорость такого переноса веществ весьма незначительна. Транспорт большинства растворенных веществ осуществляется через мембрану с помощью специальных механизмов переноса. Это молекулы-переносчики, циркулирующие между внешним и внутренним пограничными слоями цитоплазматической мембраны. Считают, что эти расположенные в мембране переносчики связывают молекулы растворенных веществ на ее внешней стороне и транспортируют их к внутренней, откуда они высвобождаются в цитоплазму без изменения. Эти связанные с цитоплазматической мембраной переносчики, представляющие собой белки, называются *пермеазами*.

Известны два типа процессов переноса растворенных веществ, осуществляемых пермеазами.

**Первый тип** – облегченная диффузия. Движущей силой этого процесса является разница в концентрации какого-либо вещества по обе стороны мембраны. При этом молекула вещества соединяется с молекулой-переносчиком у наружной поверхности мембраны и образовавшийся комплекс диффундирует через мембрану к ее внутренней стороне. Там он диссоциирует, и освобожденное вещество оказывается внутри клетки. Затем переносчик диффундирует обратно к наружной поверхности и сразу же может присоединить к себе другую молекулу вещества. Облегченная диффузия не требует расхода энергии, если наружная концентрация вещества выше внутренней, и вещество, таким образом, перемещается «вниз» по химическому градиенту. Скорость ее зависит от концентрации вещества в наружном растворе. Предполагают, что выход продуктов обмена веществ из микробной клетки осуществляется по типу облегченной диффузии и проходит при участии переносчиков.

**Второй тип** процесса транспорта веществ пермеазами называется активным переносом. В этом случае растворенные вещества переносятся в клетки микроорганизмов «вверх» по химическому градиенту (или, как говорят, против градиента концентрации). Считают, что большинство веществ проникает в клетку микроорганизма в результате активного переноса. Подобный транспорт веществ нуждается в энергии (АТФ), получаемой в результате дыхания или брожения. При отсутствии источников энергии накопления веществ внутри цитоплазмы не происходит.

В норме у бактериальных клеток всегда наблюдается определенное напряжение цитоплазмы, объясняющееся осмотическим давлением клетки, при котором цитоплазма плотно прижата к оболочке. Такое постоянное напряжение клеточного содержимого называется тургором и является одним из необходимых условий роста клетки. Величина осмотического давления у бактерий колеблется в пределах  $6 \cdot 10^5$  Па.

При увеличении концентрации питательного раствора (поваренной соли или сахара) бактериальная клетка обезвоживается, цитоплазма ее сокращается и отходит от оболочки, клетка переходит в состояние расслабления и вялости. Такое явление называется *плазмолизом*.

Если концентрация раствора значительно ниже концентрации содержимого клетки (дистиллированная вода), наступает процесс, обратный плазмолизу – *плазмолитиз*. Вода проникает в бактериальную клетку, ее содержимое разбухает, форма меняется. Плазмолитиз, так же как и плазмолиз, приводит к гибели бактериальной клетки.

Как и во всех живых организмах, основную часть микробной клетки составляет вода (80–90% общей массы клетки). Элементарный состав

клеток микроорганизмов характеризуется следующими данными (в % от массы сухого вещества): углерод – 50, кислород – 20, азот – 14, водород – 8, фосфор – 3, сера – 1, калий – 1, натрий – 1, кальций – 0,5, магний – 0,5, хлор – 0,5, железо – 0,2, другие элементы – 0,3.

Некоторые микроорганизмы для развития требуют дополнительные вещества называемые ростовыми, или факторами роста. В эту группу веществ входят витамины, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, органические кислоты.

Микроорганизмы, нуждающиеся в факторах роста, называются *ауксотрофными*, а не нуждающиеся – *прототрофными*. Ауксотрофы чаще всего являются мутанты прототрофов, которые можно получить из прототрофов путем искусственного мутагенеза. Ауксотрофы отличаются от исходных прототрофов потребностью в определенных факторах роста. Они растут на сложных естественных средах, в состав которых вводится дрожжевой экстракт или (для определенных ауксотрофов) кукурузный экстракт. Если микроорганизм неспособен синтезировать то или иное соединение, оно становится для него незаменимым фактором роста.

Ростовые вещества нужны микроорганизмам в ничтожных количествах (мкг/л). Они чаще всего входят в состав ферментов и поэтому играют незаменимую роль в физиологии микробной клетки.

## Дыхание бактерий

Дыхание, или биологическое окисление, основано на окислительно-восстановительных реакциях, идущих с образованием АТФ-универсального аккумулятора химической энергии. Энергия необходима микробной клетке для ее жизнедеятельности. При дыхании происходят процессы окисления и восстановления: окисление – отдача донорами (молекулами или атомами) водорода или электронов; восстановление – присоединение водорода или электронов к акцептору. Акцептором водорода или электронов может быть молекулярный кислород (такое дыхание называется аэробным) или нитрат, сульфат, фумарат (такое дыхание называется анаэробным – нитратным, сульфатным, фумаратным).

Анаэробноз (от греч. «аега» – воздух + «биос» – жизнь) – жизнедеятельность, протекающая при отсутствии свободного кислорода. Если донорами и акцепторами водорода являются органические соединения, то такой процесс называется брожением. При брожении происходит ферментативное расщепление органических соединений, преимущественно углеводов, в анаэробных условиях. С учетом конечного продукта расщепления углеводов различают спиртовое, молочнокислое, уксуснокислое и другие виды брожения.

По отношению к молекулярному кислороду бактерии можно разделить на три основные группы: облигатные, т.е. обязательные, аэробы, облигатные анаэробы и факультативные анаэробы. Облигатные аэробы могут расти только при наличии кислорода. Облигатные анаэробы растут только на среде без кислорода, который для них токсичен. При наличии кислорода бактерии образуют перекисные радикалы кислорода, в том числе перекись водорода и супероксид-анион кислорода, токсичные для облигатных анаэробных бактерий, поскольку они не образуют соответствующие инактивирующие ферменты. Аэробные бактерии инактивируют перекись водорода и супероксид-анион соответствующими ферментами (каталазой, пероксидазой и супероксиддисмутазой). Факультативные анаэробы могут расти как при наличии, так и при отсутствии кислорода, поскольку они способны переключаться с дыхания в присутствии молекулярного кислорода на брожение в его отсутствие. Факультативные анаэробы способны осуществлять анаэробное дыхание, называемое нитратным: нитрат, являющийся акцептором водорода, восстанавливается до молекулярного азота и аммиака.

Среди облигатных анаэробов различают аэротолерантные бактерии, которые сохраняются при наличии молекулярного кислорода, но не используют его.

Для выращивания анаэробов в бактериологических лабораториях применяют анаэростаты – специальные емкости, в которых воздух заменяется смесью газов, не содержащих кислорода. Воздух можно удалять из питательных сред путем кипячения, с помощью химических адсорбентов кислорода, помещаемых в анаэростаты или другие емкости с посевами.

Дыхание микробов – это биологический процесс, сопровождаемый окислением или восстановлением различных, преимущественно органических, соединений с последующим выделением энергии в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), необходимой микробам для физиологических нужд.

По типу дыхания микроорганизмы классифицируют на четыре основные группы:

**Облигатные (безусловные) аэробы** растут при свободном доступе кислорода, обладают ферментами, позволяющими передать водород от окисляемого субстрата конечному акцептору – кислороду воздуха. К ним относятся уксуснокислые бактерии, возбудители туберкулеза, сибирской язвы и многие другие.

**Облигатные (безусловные) анаэробы** развиваются при полном отсутствии кислорода в окружающей среде. Анаэробные условия необходимы маслянокислым бактериям.

**Микроаэрофильные бактерии** развиваются при низкой (до 1%) концентрации кислорода в окружающей атмосфере. Такие условия благоприятны для актиномицетов, лептоспир, бруцелл.

**Факультативные анаэробы** вегетируют как при доступе кислорода воздуха, так и в отсутствии его. Имеют соответственно два набора ферментов. Это многочисленная группа микроорганизмов, к которой относятся, в частности, энтеробактерии.

При дыхании происходит полное разрушение органических веществ с выходом большого количества энергии и образованием бедных энергией конечных продуктов ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ). При брожении осуществляется неполный распад органических веществ с высвобождением незначительного количества энергии и накоплением богатых энергией конечных продуктов (этилового спирта, молочной, масляной и других кислот). Высвобождающаяся при катаболизме органических веществ свободная энергия аккумулируется в форме энергии фосфатных связей аденозинтрифосфата (АТФ).

При **аэробном дыхании** акцептором водорода является кислород, при **анаэробном** – неорганические окисленные соединения типа нитратов, сульфатов, при **брожении** – органические соединения.

### **Закономерности роста и размножения бактерий**

Термин «рост» означает увеличение цитоплазматической массы отдельной клетки или группы бактерий в результате синтеза клеточного материала (например, белка, РНК, ДНК). Достигнув определенных размеров, клетка прекращает рост и начинает размножаться.

Под **размножением** микробов подразумевают способность их к самовоспроизведению, увеличению количества особей на единицу объема. Иначе можно сказать: размножение – это повышение числа особей микробной популяции.

Размножаются бактерии обычно путем деления клетки пополам. При этом в средней части клетки путем кольцевидного вращающегося оболочка образуется перегородка, которая, расщепляясь, разделяет клетку на две новые. Перегородка может возникнуть и не в центре клетки, и новые клетки получаются неодинакового размера. Делению клетки предшествуют значительные в ней изменения – перегруппировка содержимого, ядерной субстанции, включений и др.

У шаровидных бактерий перегородка может проходить по любому из диаметров клетки. Если при делении кокков перегородка последовательно располагается в одной плоскости (параллельно предыдущей) и

клетки не разъединяются, то образуются различной длины цепочки из кокков (стрептококки).

Когда кокки делятся последовательно в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, образуются сростки из восьми клеток в виде пакетов (сарцины), а при последовательном делении в различных плоскостях возникают беспорядочные скопления клеток. У некоторых бактерий эти скопления сходны с гроздьями винограда (стафилококки).

Палочковидные и извитые формы образуют перегородку перпендикулярно их длинной оси.

К характерным особенностям бактерий относится способность чрезвычайно быстро размножаться: при благоприятных условиях жизни через каждые 20–30 мин количество их может удваиваться. При таком интенсивном размножении число поколений одной клетки в течение суток будет около 60, и число клеток достигнет огромных величин. Проявление этой особенности бактерий наблюдается часто. Так, быстрое прокисание оставленного в теплом месте молока происходит в результате массового размножения кислотообразующих бактерий. Очень быстро портятся вследствие размножения гнилостных бактерий мясные, рыбные и другие продукты.

На скорость размножения бактерий влияет состав питательной среды, температура и другие условия жизни.

Бактерии размножаются в геометрической прогрессии. Если считать, что при оптимальных условиях бактерия удваивается каждые 30 минут, то через час их будет 4, через два часа – 16, через 4–256, через 15 – миллионы. Через год их объем будет составлять до  $1000 \text{ м}^3$ , а масса – свыше 400 т.

### Фазы развития бактериальной популяции

Общую закономерность роста и размножения бактериальной популяции принято показывать графически в виде кривой, которая отражает зависимость логарифма числа живых клеток от времени.

Кривая, которая описывает зависимость логарифма числа живых клеток от времени культивирования, называется *кривой роста*.

Различают четыре основных фазы роста периодической культуры: начальную (или лаг-) фазу, экспоненциальную (или логарифмическую) фазу, стационарную и фазу отмирания.

Время, на протяжении которого происходит деление микроба, называется **временами генерации**.

Типичная кривая роста имеет S-образную форму и позволяет различать несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности (рис. 6).

1. **Начальная (или лаг-) фаза.** Представляет собой время от момента посева бактерий на питательную среду до их роста. В этой фазе число живых бактерий не увеличивается, а может даже уменьшаться. Продолжительность исходной фазы 1–2 ч.

2. **Фаза задержки размножения.** В течение этой фазы бактериальные клетки интенсивно растут, но слабо размножаются. Период этой фазы занимает около 2 ч и зависит от ряда условий: возраста культуры (молодые культуры приспосабливаются быстрее, чем старые); биологических особенностей микробных клеток (для бактерии кишечной группы характерен короткий период приспособления, для микобактерий туберкулеза – длительный); полноценности питательной среды, температуры выращивания, концентрации  $\text{CO}_2$ , pH, степени аэрации среды, окислительно-восстановительного потенциала и др. Нередко обе фазы объединяют термином «лаг-фаза» (англ. lag – отставание, запаздывание).

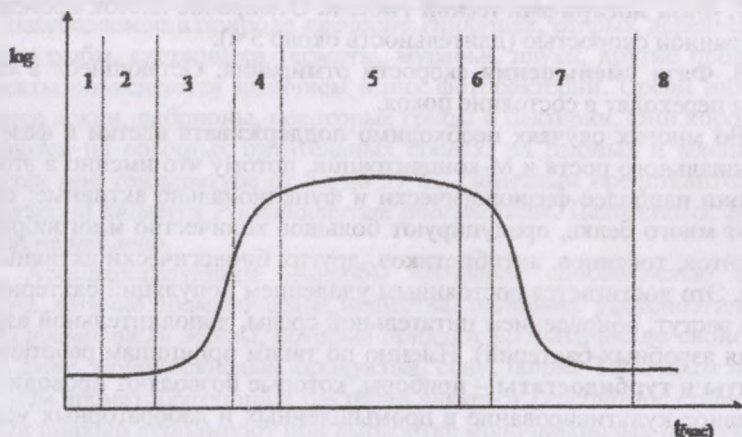


Рисунок 6 – Кривая роста микробной популяции *in vitro* при периодическом культивировании

3. **Логарифмическая фаза.** В этой фазе скорость размножения клеток и увеличение бактериальной популяции максимальны. Период генерации (лат. «generatio» – рождение, воспроизведение), т. е. время, прошедшее между двумя последовательными делениями бактерий, в этой стадии будет постоянным для данного вида, а количество бактерий станет удваиваться в геометрической прогрессии.

Это означает, что в конце первой генерации из одной клетки формируются две, в конце второй генерации обе бактерии, разделяясь, образуют четыре, из полученных четырех формируются восемь и т. д. Длительность логарифмической фазы составляет 5–6 ч.

**4. Фаза отрицательного ускорения.** Скорость размножения бактерий перестает быть максимальной, число делящихся особей уменьшается, а число погибших увеличивается (длительность около 2 ч). Одна из возможных причин, замедляющих размножение бактерий, – истощение питательной среды, т. е. исчезновение из нее веществ, специфических для данного бактериального вида.

**5. Стационарная фаза максимума.** В ней число новых бактерий почти равно числу отмерших, т. е. наступает равновесие между погибшими клетками и вновь образующимися. Продолжается эта фаза 2 ч.

**6. Фаза ускорения гибели.** Характеризуется прогрессивным превосходством числа погибших клеток над количеством вновь зарождающихся. Длится она около 3 ч.

**7. Фаза логарифмической гибели.** Отмирание клеток происходит с постоянной скоростью (длительность около 5 ч).

**8. Фаза уменьшения скорости отмирания.** Остающиеся в живых клетки переходят в состояние покоя.

Во многих случаях необходимо поддерживать клетки в фазе экспоненциального роста и М-концентрации, потому что именно в этот период они наиболее физиологически и функционально активные: синтезируют много белка, продуцируют большое количество многообразных ферментов, токсинов, антибиотиков, других биологически активных веществ. Это достигается постоянным удалением популяций бактерий, которые растут, обновлением питательной среды, дополнительной аэрацией (для аэробных бактерий). Именно по таким принципам работают хемостаты и турбидостаты – приборы, которые позволяют проводить непрерывное культивирование в промышленных и лабораторных условиях.

### **Синтез микробных пигментов, флуоресцирующих и ароматических веществ**

Микроорганизмы в процессе жизнедеятельности синтезируют красящие вещества – пигменты, придающие колониям бактериальных культур разнообразный цвет и оттенки, что учитывается при дифференциации микроорганизмов. Различают красные пигменты (актиномицеты, дрожжи, грибы, «чудесная палочка» – *Bact. prodigiosum*), желтые или оранжевые (микобактерий туберкулеза, сарцины, стафилококки), синие

(синегнойная палочка – *Pseudomonas aeruginosa*, бактерия синего молока – *Bact. synchyaneum*), фиолетовые (*Chromobacterium violaceum*), черные (некоторые виды грибов, дрожжей, почвенных микробов).

Образование пигментов происходит в присутствии кислорода при комнатной температуре и пониженном освещении. Микроорганизмы, развиваясь на пищевых продуктах (молоко, сыр, мясо, рыба, масло, творог), изменяют их цвет. Различают пигменты, растворимые в воде (синегнойная бактерия, бактерии сине-зеленого молока – пиоцианин, синцианин), в спирте (пигменты «чудесной» бактерии, стафилококков и сарцин – красный, золотистый, лимонно-желтый и желтый), не растворимые ни в воде, ни в спирте (черные пигменты дрожжей, грибов, азотобактера), выделяющиеся в окружающую среду (хромонарные), остающиеся в теле микроорганизмов (хромофорные).

Светящиеся микроорганизмы (фотобактерии) вследствие окислительных процессов в бактериальной клетке обладают способностью свечения (люминесценции). Фотобактерии являются строгими аэробами, при прекращении доступа кислорода свечение у них приостанавливается. Наблюдаемое в природе свечение гнилушек, старых деревьев, мяса, чешуи рыбы, светящиеся термиты, муравьи, пауки, другие предметы и объекты объясняются наличием в них фотобактерий. Среди них встречаются кокки, вибрионы, некоторые грибы и бактерии. Они хорошо развиваются на обычных питательных средах, на рыбных и мясных субстратах при температуре от 15 до 37°C. Типичным представителем фотобактерий является *Photobacterium phosphoreum*. Патогенных фотобактерий не найдено.

Ароматобразующие микробы обладают способностью вырабатывать летучие ароматические вещества, например уксусноэтиловый и уксусноамиловый эфиры, которые придают ароматические свойства винам, пиву, молочнокислым продуктам, селю, почве. Типичным представителем ароматобразующих бактерий является *Leuconostoc cremoris*, который широко используют при выработке молочнокислых продуктов.

## Систематика и номенклатура микроорганизмов

Систематика как наука занимается проблемами классификации, номенклатуры и идентификации организмов.

Задачей классификации является объединение микроорганизмов с общими свойствами в определенные группы.

Номенклатура дает названия отдельным группам и микроорганизмам, принадлежащим к ним.

**Идентификация** устанавливает принадлежность микроорганизмов к определенному таксону на основании конкретных признаков.

Категории таксономической иерархии – таксоны: вид → род → трибо или колено → семейство → порядок → класс → отдел → царство.

Названия основных таксонов у микроорганизмов: род и выше – обозначаются одним словом; вид – обозначаются двумя словами: название рода и вида; штамм – культура микроорганизмов, выделенная из определенного источника; клон – культура микроорганизмов, полученная из одной исходной клетки.

Вид является самой мелкой систематической единицей. Близкородственные виды (*species*) объединяются в роды (*genus*), роды – в семейства (*familia*), семейства – в порядки (*ordo*), порядки – в классы (*classis*), классы – в отдел (*divisio*), отделы – в царство (*regnum*). Высшей систематической единицей является царство. Бактерии относятся к царству *Procaryotae*.

В микробиологии, также как и в ботанике и зоологии, принята *биннарная номенклатура* (К. Линней). Первое слово – название рода. Оно пишется с прописной буквы и характеризует какой-либо морфологический или физиологический признак микроорганизма, либо фамилию ученого, открывшего этот микроорганизм, либо особый отличительный признак, например местообитание. Второе слово пишется со строчной буквы. Оно обозначает видовое название микроорганизма, характеризующее некоторые отличительные признаки. Например, *Bacillus anthracis*, родовое название – *Bacillus*, видовое – *anthracis*.

Название микроорганизмам присваиваются в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий, введенного с 1 января 1980 года, они едины во всех странах мира.

В микробиологии часто пользуются термином «штамм» и «клон».

**Штамм** – это более узкое понятие, чем вид. Обычно штаммами называют различные культуры микроорганизмов одного и того же вида. Штаммы одного вида могут быть достаточно близкими по своим свойствам или различаются по отдельным признакам. В то же время свойства разных штаммов не выходят за пределы вида.

**Клон** – это культура, полученная из одной клетки. Совокупность (популяция) микроорганизмов, состоящая из особей одного вида, называется чистой культурой.

Группа прокариотов, клетки которых обладают ригидной клеточной стенкой, имеющих форму прямой или изогнутой палочки, а также форму шара, делящихся бинарным путем, выделена как собственно группа бактерий. Многие из них имеют жгутики и способны образовать

вать споры, причем эта способность не является формой размножения клеток.

Систематика бактерий – сложная проблема. До сих пор нет единой, естественной их классификации, отражающей эволюционное развитие отдельных видов бактерий. Положение многих бактерий в системе организмов еще точно не установлено.

Морфологические признаки бактерий, служащие основным критерием (как у растений, так и у животных) для выявления между ними естественных – эволюционных связей, не многочисленны и не постоянны. Варьируют и физиологические свойства в зависимости от условий развития.

Однако все же разработаны системы классификации бактерий (называемые «определителями»), которые хотя и являются искусственными по построению (без учета эволюционных связей), но позволяют идентифицировать (определять) бактерии.

При распознавании бактерий учитывают морфологические признаки (форму, размеры, наличие и положение жгутиков, способность к спорообразованию), а также физиологические и биохимические свойства (используемые источники питания, характер получения энергии, потребность в кислороде, патогенность и др.). В последние годы начинают учитывать также серологические свойства (реакции с иммунными сыворотками) и состав ДНК.

В соответствии с принятыми в биологии правилами название каждому организму, в том числе бактериям, дается на латинском языке и состоит оно из двух слов: первое обозначает род, к которому принадлежит данная бактерия, второе – название вида. Родовое название пишется с прописной буквы, видовое – со строчной. Например, *Streptococcus lactis* относится к шаровидным бактериям, образующим цепочки (род *Streptococcus*), они вызывают скисание молока в результате сбраживания сахара в молочную кислоту, отсюда видовое название *lactis*.

В настоящее время в микробиологии существуют два различных подхода к систематике, обуславливающие два вида классификации. Одни исследователи считают, что классификация должна отражать историю развития организмов и строится на филогенетической основе. Это **естественная классификация**.

В 1936–1950 гг. исследователи голландской школы Клюйвер ван Ниль и Стенер разрабатывали филогенетические подходы к систематике бактерий. В России сторонником этого направления был Н. А. Красильников.

Н. А. Красильников относит бактерии к группе *Schizomyceae* – простейшие организмы, не содержащие хлорофилла. Эта группа подразделяется на четыре класса:

- актиномицеты (*Actinomycetes*);
- настоящие бактерии (*Eubacteriae*) – различные бактерии, характеристика которых в основном была дана выше;
- миксобактерии (*Mycobacteriae*);
- спирохеты (*Spirochaetae*).

По этой системе бактерии – возбудители порчи пищевых продуктов, а также используемые в технологии переработки пищевого сырья – являются представителями двух классов: *Eubacteriae* и *Actinomycetes*.

К важнейшим семействам класса *Eubacteriae* относятся:

- *Pseudomonadaceae* – неспороносные, аэробные, грамотрицательные палочковидные бактерии, подвижные – с полярными жгутиками;
- *Bacteriaceae* – палочковидные, не образующие спор, подвижные – жгутики располагаются по всей клетке;

Класс *Actinomycetes* представлен двумя важнейшими семействами:

- *Mycobacteriaceae* – включающее пропионовокислые и палочковидные молочнокислые бактерии;
- *Coccaceae* – грамположительные шаровидные бактерии одиночные и в различных сочетаниях.

Второй подход к систематике основан на учете признаков, удобных с точки зрения практики. Это *искусственная, или традиционная*, классификация. Она чаще всего заранее подчинена конкретным задачам. При такой классификации признаки, определяющие принадлежность организма к той или иной таксономической единице, часто выбираются произвольно. Иногда микроорганизмы объединяются в группы на основании одного ведущего признака. Поэтому группы микроорганизмов, классифицированные по данной систематике, могут иметь большое практическое значение, но не соответствуют естественной классификации. Искусственная классификация предназначена для определения той группы организмов, которая интересует исследователя.

Искусственная классификация положена в основу «Определителя бактерий Берджи» (1974, 1984, 1992).

Исследователь должен выяснить, является ли организм фототрофным, хемоавтотрофным или хемогетеротрофным. Необходимо также знать, является ли он аэробом, анаэробом, микроаэрофилом или факультативным анаэробом, а также определить некоторые морфологические свойства, окраску по Граму, форму клеток, специфические морфологические признаки (наличие спор, капсул и т. д.).

Определитель Берджи выделяет четыре основных категорий бактерий: *Gracillicutes* – виды с тонкой клеточной стенкой, окрашивающиеся грамотрицательно; *Firmicutes* – бактерии с толстой клеточной стенкой, окрашивающиеся грамположительно; *Tenericutes* – бактерии, лишенные

клеточной стенки (микоплазмы и прочие представители); *Mendosicutes* - архе

Принципы систематизации бактерий в определителе Берджи. Определитель Берджи систематизирует все известные бактерии по принципам идентификации бактерий, основанным на различиях в строении клеточной стенки и отношении к окраске по Граму.

В «Определителе Берджи» бактерии отнесены к классу *Schizomycetes*, который подразделен на 10 порядков. Большинство бактерий, изучаемых в пищевой микробиологии, содержатся в двух порядках:

– *Pseudomonadales* – грамотрицательные, не образующие спор аэробные бактерии с полярным жгутиком, а также вибрионы и спириллы;

– *Eubacteriales* – обширная группа типичных бактерий шаровидной и палочковидной форм, спорообразующие и не образующие спор, неподвижные и подвижные с перитрихально расположенными жгутиками. Важнейшие семейства этого порядка следующие:

*Lactobacillaceae* – бесспорные, грамположительные палочковидные и кокковидные бактерии, вызывающие молочнокислое брожение;

*Propionibacteriaceae* – не образующие спор, грамположительные палочковидные бактерии, вызывающие пропионовокислое брожение;

*Enterobacteriaceae* – грамотрицательные палочковидные бактерии, факультативные анаэробы; к этому семейству принадлежат бактерии колиформной группы;

*Micrococcaceae* – шаровидные формы, одиночные или в виде виноградных гроздей.

Одной из причин, затрудняющей классификацию микроорганизмов, является отсутствие точно установленных критериев, служащих для определения вида. По аналогии с систематикой высших организмов в микробиологии принято считать основной систематической единицей вид исходя из того, что под этим названием объединяется группа микроорганизмов, наделенная общими признаками и происходящая от общего предка.

### **Микроорганизмы, отличающиеся от истинных бактерий** **Нитчатые бактерии**

Эти бактерии представляют собой длинные нити диаметром от 1 до 7 мкм, состоящие из коротких цилиндрических клеток. Каждая нить окружена тонкой слизистой оболочкой (влагалищем-чехлом). Размножаются эти бактерии с помощью особых клеток – гонидий, которые развиваются из концевых клеток нитей. Гонидии могут быть подвижными

(со жгутиками). В благоприятных условиях гонидии прорастают в новые нити. В пределах влаги клетки размножаются делением.

Нитчатые бактерии обитают преимущественно в воде, встречаются и в почве.

### **Миксобактерии (Скользящие бактерии)**

Миксобактерии имеют палочковидную и веретенообразную форму. Они способны к образованию больших количеств слизи. Клеточная оболочка, присущая истинным бактериям, у миксобактерии отсутствует. Оболочка их клеток очень тонкая и эластичная, поэтому миксобактерии при передвижении изгибаются и делают скольльзящие движения. Размножаются они делением или перешнуровыванием клетки. Некоторые в неблагоприятных условиях переходят в покоящуюся стадию — цисту (рис. 7).



**Рисунок 7 – Миксобактерии**

Слизистые скопления цист, называемые плодовыми телами, бывают различных форм и размеров, нередко окрашены. Миксобактерии живут в почве, на различных растительных остатках.

### **Спирохеты**

Спирохеты представляют собой гибкие спирально извитые клетки различной длины (рис. 8). Дифференцированное ядро и присущая истинным бактериям оболочка отсутствуют. Клетки покрыты тонкой цитоплазматической мембраной. Они подвижны, передвигаются волнообразным сокращением тела. Спор не образуют. Размножаются делением.

Спирохеты занимают промежуточное положение между истинными спиральными бактериями и протистами.



**Рисунок 8 – Спирохеты**

### **Актиномицеты**

Актиномицеты, или лучистые грибки, – это одноклеточные организмы, обладающие способностью ветвиться (рис. 9). Одни (собственно актиномицеты) растут в виде тонких ветвящихся нитей диаметром 0,5–1,0 мкм, образующих мицелий, другие похожи на обычные палочковидные бактерии, но искривлены или имеют небольшие боковые выросты; встречаются и кокковидные формы.

Оформленного ядра у актиномицетов, как и у бактерий, не обнаружено. Мицелиевидные формы размножаются спорами, развивающимися на воздушных ветвях мицелия, что сближает эти актиномицеты с грибами. Немицелиевидные формы размножаются делением и перешнуровыванием клеток. Некоторые актиномицеты окрашены (красные, коричневые и др.).



**Рисунок 9 – Актиномицеты**

Они широко распространены в природе, встречаются они также на пищевых продуктах и могут вызвать их порчу. При развитии некоторых актиномицетов субстрат приобретает специфический землистый запах.

Многие из них вырабатывают антибиотики. Есть среди них и болезнетворные формы (например, туберкулезные и дифтерийные бактерии).

Актиномицеты являются переходными микроорганизмами между бактериями и грибами.

### Риккетсии

Риккетсии – это мелкие, длиной не более 1 мкм, неподвижные бактериоподобные организмы, видимые в световой микроскоп. Они сочетают признаки истинных бактерий и вирусов и занимают промежуточное положение между ними. Электронно-микроскопические исследования показывают, что по внутренней структуре они сходны с истинными бактериями. Форма риккетсий разнообразна: округлые, палочковидные; одиночные, соединенные попарно или в короткие цепочки. В клетках обнаруживаются зернистые включения хроматиновой природы (рис. 10).

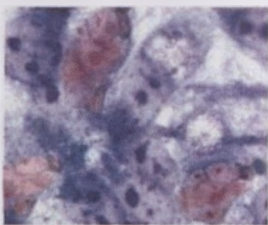


Рисунок 10 – Риккетсии

Риккетсии – внутриклеточные паразиты, на искусственных питательных средах они не растут.

Заболевания человека и животных, вызываемые риккетсиями, называются риккетсиозами (сыпной тиф, кулихорадка и др.).

### Микоплазмы

Микоплазмы являются малоизученными микроорганизмами. Клетки их не имеют плотной оболочки, поэтому им свойствен полиморфизм (разнообразии форм). Они встречаются в виде различной величины кокков, нитей, розеток. Размеры их настолько малы, что они не видимы в обычных световых микроскопы (рис. 11).

Эти микроорганизмы проходят через бактериологические фильтры, которые не пропускают истинные бактерии. Они сходны с так называемыми L-формами истинных бактерий, которые тоже являются фильтру-

ющимися формами и не имеют оболочки. Однако невидимые в световой микроскоп L-формы могут вновь превращаться в видимые формы соответствующих бактерий. Существуют, однако, и стабильные L-формы бактерий.

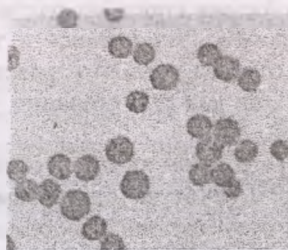


Рисунок 11 – Микоплазмы

Микоплазмы широко распространены в природе, некоторые из них являются паразитами животных и растений. На основе генома микоплазм впервые был синтезирован искусственный геном (*Mycoplasma laboratorium*).

### Области применения микроорганизмов-прокариот в биотехнологии

Бактерии широко используются в пищевой промышленности как естественные окислители при изготовлении кисломолочных продуктов, квашении капусты. Бактерии также используют при очищении сточных вод от органических примесей. Огромное количество бактерий живет в пищеварительном тракте животных и человека, создавая благоприятные условия для переваривания пищи. Широко используются бактерии для изготовления лекарственных препаратов, например интерферона.

Среди бактерий чаще всего применяют в биотехнологии представителей следующих родов: *Acetobacter*, которые превращают этанол в уксусную кислоту и уксусную кислоту в углекислый газ и воду; *Bacillus* – для получения ферментов (*B. subtilis*), средств защиты растений (*B. thuringiensis*); *Clostridium* – для сбраживания сахаров в ацетон, этанол, бутанол; молочнокислые бактерии (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*); псевдомонады – например *P. glutamatum* – для получения витамина В<sub>12</sub>, *Corynebacterium* – для получения аминокислот и др.

Бактерии, обитающие в недрах Земли, широко используются в биоготехнологии при добыче, превращении и переработке природных ископаемых, нефти и газа. Биоготехнология получения металлов эксплуатиру-

ет способности отдельных бактерий переводить металлы в растворимые соединения (выщелачивание металлов из руды). *Thiobacillus ferrooxydans* выщелачивает железо, медь и другие металлы с помощью окисления серной кислоты, которую образуют эти бактерии из сульфида.

*Chromobacterium violaceum* способна растворять золото. Получены высокоэффективные штаммы *Pseudomonas* и термофильной бактерии *Sulfolobus* для удаления серы из угля, что является одной из важнейших экологических проблем, так как при сгорании уголь сильно загрязняет окружающую среду серой.

Перспективным направлением является обогащение руд с помощью сероокисляющих бактерий, очистка бактериями загрязненных нефтепродуктами или ксенобиотиками почв и водоемов.

Сегодня более 70% всех антибиотических веществ, выпускаемых промышленностью и нашедших широкое применение, синтезируются актиномицетами. Эритромицин, стрептомицин, рифамицин, канамицин, тетрациклин – продукты жизнедеятельности актиномицетов. На их основе получен ряд полусинтетических форм антибиотиков.

К антибиотикам относят вещества природного или синтетического происхождения, способные избирательно подавлять рост или уничтожать другие микроорганизмы. Первым из антибиотиков был открыт пенициллин, в 1929 г. Александр Флеминг наблюдал подавление роста стафилококка плесневым грибом *Penicillium notatum* (по современной таксономии *P. chrysogenum*). В настоящее время антибиотики нашли применение не только для лечения инфекционных болезней человека, но и как противоопухолевые препараты. Их используют в пищевой промышленности при консервировании продуктов, а также в животноводстве.

Спирохеты рода *Spiro haeta* сбраживают глюкозу с образованием уксусной, молочной, щавелевой, муравьиной кислот, этанола,  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ .

### Контрольные вопросы:

- 1 Основные отличия в организации клеток прокариот и эукариот.
- 2 Структура и химический состав бактериальной клетки.
- 3 Особенности строения грамположительных и грамотрицательных бактерий.
- 4 Рост и размножение бактерий. Фазы размножения.
- 5 Типы и механизмы питания бактерий
- 6 Основные принципы классификации микробов.
- 7 Приведите примеры использования микроорганизмов прокариот в биотехнологии.

## ТЕМА 4. МОЛОЧНОКИСЛЫЕ И УКСУСНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ

### Общая характеристика молочнокислых и уксуснокислых бактерий

**Молочнокислые бактерии (МКБ)** – группа микроаэрофильных грамположительных микроорганизмов, сбраживающих углеводы с образованием молочной кислоты как одного из основных продуктов.

Традиционно к молочнокислым бактериям относят неподвижных, неспорообразующих кокковидных или палочковидных представителей отряда *Lactobacillales* (например, *Lactococcus lactis* или *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*).

Многие МКБ изначально присутствуют в молоке и вызывают его спонтанное сквашивание. Молочная кислота в молоке отщепляет кальций от казеина, белок превращается в параказеин и выпадает в осадок, что вызывает свертывание молока, образование молочного сгустка. При изготовлении молочных продуктов, таких как масло, сыр, йогурт, широко используются молочнокислые бактерии. При изготовлении сыра первичное молочнокислое брожение осуществляется гомоферментативными лактококками *L. lactis subsp. cremoris u lactis*, а затем в процесс включаются термофильные МКБ рода *Lactobacillus* или микроорганизмы других таксономических групп, например, пропионовые. Часто при изготовлении сыров используют МКБ в симбиозе с грибами, плесенями.

МКБ можно разделить на две группы:

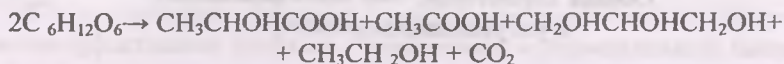
1) гомоферментативные, образующие из сахара в основном молочную кислоту по схеме:



Гомоферментативные МКБ включают морфологически разные группы – кокки (*Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*) и палочковидные формы (*Lactobacillus*).

Основной энергетический субстрат для МКБ, осуществляющих гомоферментативное молочнокислое брожение – моносахара (в первую очередь, глюкоза) и дисахара (лактоза, мальтоза). Распад отдельных, существенных для бактерий углеводов завершается, как правило, образованием трех главных моносахаров – глюкозы, фруктозы и галактозы, которые служат исходным материалом для осуществления различных реакций обмена веществ.

2) гетероферментативные, образующие наряду с молочной кислотой значительные количества побочных продуктов (уксусная кислота, этиловый спирт, углекислый газ):



Представителями гетероферментативных МКБ являются некоторые палочковидные бактерии р. *Lactobacillus* и *Streptobacterium*, вариабельные по форме бифидобактерии из рода *Bifidobacterium* и кокковые – р. *Leuconostoc*. Известен другой тип гетероферментативного молочнокислого брожения, когда бактерии вместо этанола образуют другие спирты, например, манит (*Leuconostoc mesenteroides*) или глицерин.

Молочнокислые бактерии играют важную роль в приготовлении теста, вина, кофе, какао и силоса. Несмотря на близкое родство, патогенные представители отряда *Lactobacillales* (например, пневмококки *Streptococcus pneumoniae*) обычно исключаются из группы молочнокислых бактерий

По форме клеток МКБ представляют собой кокки сферической или эллипсовидной формы и палочки разной длины и формы. Бактерии рода *Lactococcus* – круглые или слегка овальные клетки, расположенные одиночно, парами или цепочками. Типичный представитель этого рода *L. lactis subsp. lactis* некоторые считают палочковидной формой, поскольку его клетки больше в длину, чем в ширину, а в сброженном молочном ступке преобладают сочетания в виде диплококков. Сливочный лактококк *L. lactis subsp. cremoris* отличается от предыдущего тем, что клетки располагаются в виде длинных цепочек (рис. 12).

Основным свойством МКБ, по которому их объединяют в отдельную обширную группу микроорганизмов, является способность образовывать в качестве главного продукта брожения молочную кислоту.

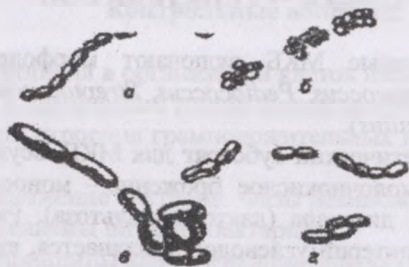


Рисунок 12 – Форма клеток молочнокислых бактерий:

а – кокки – *Leuconostoc oenos* (x 6000); б – *Pediococcus cerevisiae* (x 5000);  
в – палочки – *Lactobacillus casei* (x 8500); г – *Lactobacillus brevis* (x 5500)

Важнейшие признаки МКБ:

- способность к синтезу молочной кислоты;
- грамположительность;
- отсутствие спор;
- неподвижность;
- форма клеток (кокки и палочки);
- требовательность к источникам азота: пептоны и смесь аминокислот (многие из них не развиваются на простых синтетических средах);
- требовательность к присутствию витаминов;
- отсутствие фермента каталазы;
- участие в расщеплении перекиси водорода до воды и кислорода;
- по отношению к молекулярному кислороду МКБ являются аэротолерантными анаэробами;
- кислотоустойчивость (кокковые формы могут развиваться в нейтральных и щелочных средах, большинство же палочковидных форм не способны расти в среде с рН выше 6,0; бифидобактерии не растут при рН выше 8,2).

– Уксуснокислые бактерии (*Acetobacteraceae*) – семейство бактерий, которые получают энергию, окисляя этанол до уксусной кислоты.

Уксуснокислые бактерии – *Gluconobacter*, *Acetobacter* грамотрицательные, палочковидные бесспорные строгоаэробные организмы, развивающиеся в тех же условиях, что и дрожжи. Этиловый спирт – главный источник жизнедеятельности уксуснокислых бактерий.

Наиболее распространенные виды уксуснокислых бактерий *Acetobacter aceti*, *Acet. pasteurianum*, *Acet. oxydans*. Они имеют форму палочек длиной 1–3 мкм, часто соединены в цепочки. Оптимальная температура для роста 20–35 °С. *Acet. aceti* выдерживает 10–11 %-ную концентрацию спирта.

Уксуснокислые бактерии способны окислять этиловый спирт в уксусную кислоту по уравнению:



### Классификация молочнокислых и уксуснокислых бактерий

Первую научную систему классификации молочнокислых бактерий разработал Орла Йенсен в 1919 г.

В литературе широко употребляются два равнозначных родовых названия: *лактобациллы* (*Lactobacillus*) и *лактобактерии* (*Lactobacterium*). В определителе бактерий и актиномицетов Н. А. Красильникова они отнесены к роду *Lactobacterium*. Но поскольку родовое название –

лактобациллы – вошло во многие классификации молочнокислых палочек, юридическая комиссия Международного комитета по номенклатуре бактерий в 1971 г. пришла к заключению о целесообразности сохранить в виде исключения родовое название *Lactobacillus*.

В настоящее время наибольшее признание получила классификация молочнокислых палочек, разработанная М. Рогозой и М. Шарп. В основу ее положено изучение физиолого-биохимических свойств данных микроорганизмов. Согласно предложенной классификации, молочнокислые палочки относятся к семейству *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*. В пределах рода выделено три подгруппы: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* и *Betabacterium*.

К первой относятся бактерии, которые в процессе брожения образуют в основном молочную кислоту и имеют температурный оптимум развития в пределах 40–60°C.

Во вторую группу входят виды, также образующие исключительно молочную кислоту, не развивающиеся при более низких температурах (25–37°C).

Третья группа состоит из видов, которые в процессе брожения, помимо молочной кислоты, образуют большое количество летучих кислот (уксусной, муравьиной, углекислоты).

Бейеринк ввел родовое название *Acetobacter*. Бактерии рода *Acetobacter* распределены на 3 вида (*A. aceti*, *A. pasteurianum* и *A. peroxydans*).

Н. А. Красильников положил в основу определения видов уксуснокислых бактерий биохимических особенности (наличие каталазы, усвоение аммонийной соли, минерального азота, способность к образованию пигмента) и разделил их на 4 вида: *Acetobacter peroxydans*, *A. aceti*, *A. melanogenum*, *A. xylinum*.

Фратер также использовал для классификации уксуснокислых бактерий особенности их биологической деятельности. Он предложил разделить их на 4 группы, названные по наиболее характерным представителям: *Peroxydans*, *Oxydans*, *Mesoxydans* и *Suboxydan*.

В настоящее время описано около 20 видов этих бактерий, важнейшими из них являются: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianum*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter schutzenbachii*.

Эти бактерии различаются размерами клеток, устойчивостью к спирту, способностью накапливать в среде большее или меньшее количество уксусной кислоты и другими признаками. Например, *Acetobacter aceti* накапливает в среде до 6 % уксусной кислоты, *Acetobacter orleanense* до 9,5 %, *Aschutzenbachii* до 11,5 %, *A. xylinum* до 4,5 %. *Acetobacter aceti* и *Acetobacter schutzenbachii* выдерживают довольно высокую концентрацию спирта до 9–11 %, а *Acetobacter xylinum* – лишь 5–7 %.

Активность уксуснокислых бактерии проявляется только в присутствии кислорода. Эти бактерии развиваются в сброженном сусле или в пиве при доступе воздуха, в продолжительно хранящемся сусле, в пиве, оставшемся в бочках, в заготовочных дрожжах. Уксуснокислые бактерии встречаются в воздухе, на ягодах, легко развиваются во фруктовой мезге.

### Общая характеристика брожения

Брожением называется анаэробный процесс превращения безазотистых органических веществ (главным образом углеводов) микроорганизмами, при котором происходит накопление продуктов неполного окисления (спиртов, органических кислот, углеводов и др.) и который сопровождается выделением энергии. Процессы брожения широко распространены в природе.

По своей биологической сути брожение – это анаэробный окислительно-восстановительный процесс, в котором АТФ синтезируется путем субстратного фосфорилирования при использовании в качестве источника энергии органических соединений (в строго анаэробных условиях).

При брожении продукты расщепления одного органического субстрата могут одновременно служить и донорами, и акцепторами электронов. Сбраживаться микроорганизмами могут углеводы, спирты, органические кислоты, аминокислоты, пурины, пиримидины и другие органические соединения.

При сбраживании органических соединений образуются различные органические кислоты (молочная, масляная, муравьиная, пропионовая, уксусная, янтарная), спирты (этиловый, бутиловый, пропиловый), ацетон,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  и др.

Существует несколько типов брожения лактозы, которые отличаются видом микроорганизмов, вызывающих это брожение, а также составом конечных продуктов: молочнокислое, пропионовокислое, уксуснокислое, маслянокислое, спиртовое (табл. 3).

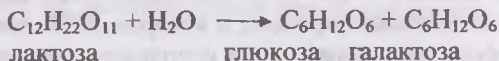
Таблица 3. Типы брожения и конечные продукты, образуемые микроорганизмами

Тип брожения	Конечный продукт	Микроорганизмы
Молочнокислое гомоферментативное гетероферментативное	молочная кислота молочная кислота + этиловый спирт, $\text{CO}_2$ , уксусная кислота, ацетон, диацетил	лактобактерии, стрептококки бифидумбактерии

Тип брожения	Конечный продукт	Микроорганизмы
Спиртовое	этанол	дрожжи
Маслянокислое	масляная кислота	кlostридии
Муравьинокислое	муравьиная кислота	энтеробактерии
Пропионовокислое	пропионовая кислота	пропионибактерии
Ацетонобутиловое	бутиловый спирт и ацетон	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

### Химизм процесса брожения

Начальным этапом всех видов брожения является расщепление лактозы на глюкозу и галактозу под действием лактазы ( $\beta$ -галактозидазы), выделяемой молочнокислыми бактериями (лактобактериями):



Процесс брожения протекает в две фазы.

Начальная фаза (окисление) представляет собой расщепление углеводов до пировиноградной кислоты (пирувата) тремя путями:

- гликолитический (гликолиз, путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, фруктозо-1,6-дифосфатный путь) – 2 АТФ и 2 НАДН<sub>2</sub>;
- пентозофосфатный (путь Варбурга-Диккенса-Хорекера-Рэкера, фосфоглюконатный путь) – 2 АТФ, 2 НАДФН, пентозофосфат и СО<sub>2</sub>;
- 2-кето-3-дезоксиглюконофосфатный (путь Энтнера-Дудорова, отличается тем, что глюкоза без фосфорилирования окисляется в глюконовую кислоту, последняя превращается в 2-кето-3-фосфоглюконовую кислоту, которая расщепляется на два С<sub>3</sub>-фрагмента: ПВК и глицериновый альдегид) – наблюдается только у бактерий рода *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, у высших организмов отсутствует – 1 АТФ, 1 НАДФ и 1 НАДН<sub>2</sub>;

Конечная (восстановление) – происходит присоединение атомов водорода для восстановления пировиноградной кислоты, при этом образуются разные продукты, в зависимости от которых выделяют разные типы брожения.

### Молочнокислое брожение

Различают три типа брожения, вызываемого молочнокислыми бактериями:

- гомоферментативное молочнокислое брожение;
- гетероферментативное молочнокислое брожение;
- бифидоброжение, осуществляемое бифидобактериями.

Гомоферментативное молочнокислое (рис. 13) брожение идет по следующему уравнению:



Рисунок 13 – Схема гомоферментативного молочнокислого брожения

Возбудителями гомоферментативного молочнокислого брожения являются, например, бактерии: *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus helveticus*, *Lactococcus acidophilus*, *Lactococcus plantarum* и др. В результате воздействия ферментов, выделяемых этой микрофлорой, глюкоза, а затем и галактоза проходят гликолитический путь расщепления Эмбдена-Мейергофа с образованием пировиноградной кислоты ( $CH_3COCOON$ , пируват), которая под действием фермента лактатдегидрогеназы (II – в приведенной ниже схеме) восстанавливается до молочной кислоты ( $CH_3CH(OH)COOH$ ) (рис. 14). Роль восстановителя выполняет НАД·Н<sub>2</sub>, образовавшийся в реакции окисления 3-фосфоглицеринового альдегида. В зависимости от условий среды (рН, температуры, наличия CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> и др.) при гомоферментативном молочнокислом брожении кроме молочной кислоты в качестве побочных продуктов в небольших количествах образуются летучие и нелетучие органические кислоты, спирты, глицерин, ацетон, диацетил, бутиленгликоль, и другие соединения, придающие специфический аромат кисло-молочным продуктам.

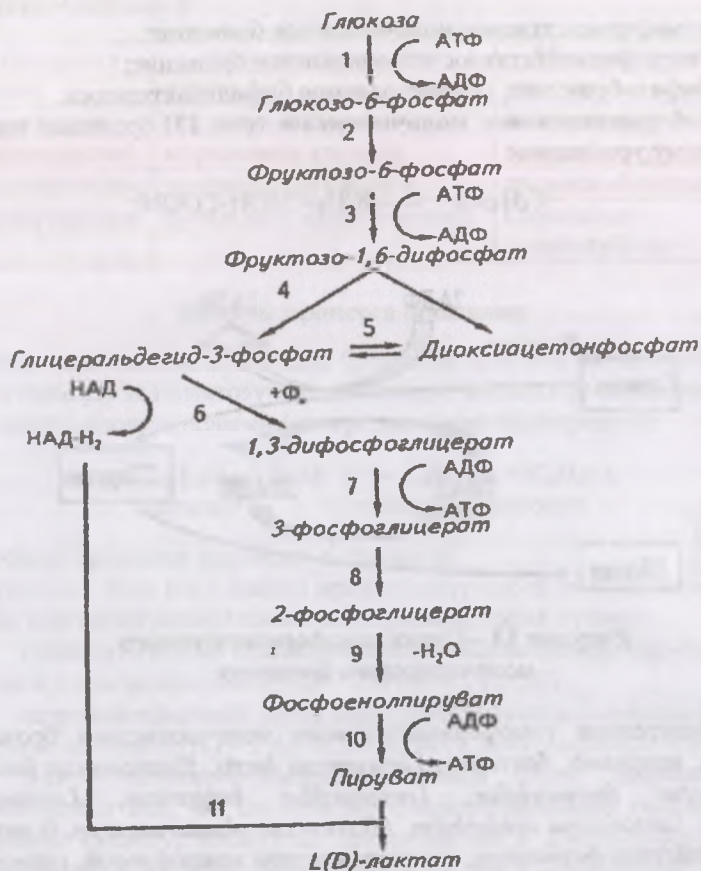
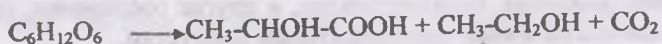


Рисунок 14 – Схема гликолитического пути (Эмбдена-Мейергофа) расщепления глюкозы лактобактериями:

- 1 – гексокиназа; 2 – глюкозофосфатизомераза; 3 – фосфофруктокиназа; 4 – альдолаза; 5 – триозофосфатизомераза; 6 – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; 7 – фосфоглицераткиназа; 8 – фосфоглицеромутаза; 9 – енолаза; 10 – пируваткиназа; 11 – лактатдегидрогеназа

Гетероферментативное молочнокислое брожение осуществляется согласно уравнению:

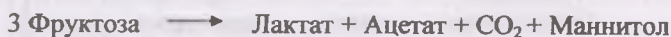


Суммарно процесс гетероферментативного молочнокислого брожения можно представить следующим образом:



Некоторые другие гетероферментативные молочнокислые бактерии приводят к образованию также ацетата.

При сбраживании фруктозы гетероферментативными молочнокислыми бактериями образуются лактат, ацетат,  $CO_2$  и маннитол:



Фруктоза при этом служит акцептором избыточных восстановительных эквивалентов:



Возбудителями гетероферментативного молочнокислого брожения являются бактерии: *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citrovorum*, *Leuconostoc dextranicum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus cellobiosus* и др.

**Бифидоброжение.** В процессе бифидоброжения, осуществляемого бифидобактериями, образуется лактат и ацетат:



Катаболизм углеводов в этом случае происходит по пентозофосфатному пути или по пути Энтнера-Дудорова (рис. 15).

Возбудителями бифидоброжения являются бактерии вида *Bifidobacterium bifidum*.

Молочнокислое брожение находит широкое применение в различных отраслях хозяйственной деятельности человека: в процессе приготовления кисломолочных продуктов, сырокопченых и сыровяленых колбас, квашения овощей и фруктов, в хлебопечении, для силосования кормов, биологической выделки кож, получения чистой молочной кислоты, которая используется в качестве консерванта в пищевой и косметической промышленности, как добавка к пищевым продуктам, в производстве пластмасс.

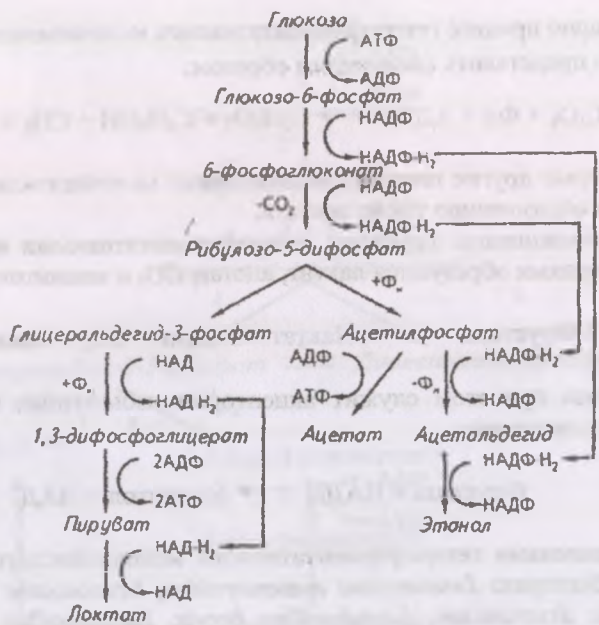


Рисунок 15 – Схема пентозофосфатного пути расщепления глюкозы гетероферментативными молочнокислыми бактериями

### Спиртовое брожение

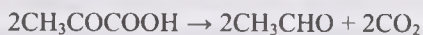
Спиртовое брожение протекает в процессе производства кумыса, кефира, курунги, ацидофильно-дрожжевого молока и других кисло-молочных продуктов под воздействием дрожжей *Saccharomyces carilaginosus*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces cerevisiae* и бактерий рода *Zimomonas*.

Этот вид брожения используют для промежуточного получения этанола, а также в виноделии, пивоварении и при подготовке теста в хлебопекарной промышленности. В присутствии  $O_2$  спиртовое брожение замедляется или прекращается и дрожжи получают энергию для жизнедеятельности в результате дыхания.

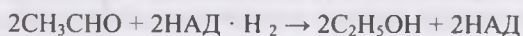
Спиртовое брожение характерно в основном для дрожжей, особенно для видов рода *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. uvarum* и др.). Спиртовое брожение осуществляют не только дрожжи, но и некоторые виды бактерий, принадлежащие к разным таксономическим группам, например, *Sarcina ventriculi*, *Erwinia amylovora*, *Zymomonas mobilis*, *Zymomonas*

*anaerobica*. Кроме них, значительные количества этанола образуют в процессе жизнедеятельности такие мезофильные бактерии, как: *Leucostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Clostridium sporogenes*, *Spirochaeta aurantia*, а также термофильные бактерии *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *C. thermocellum*.

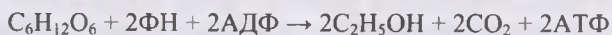
Как указывалось ранее, первая стадия всех типов брожения протекает одинаково, т.е. глюкоза сбраживается по гликолитическому пути с образованием пировиноградной кислоты – основного промежуточного продукта. Затем пировиноградная кислота декарбоксилируется под действием пируватдекарбоксилазы, содержащейся в клетках дрожжей, с образованием  $\text{CO}_2$  и уксусного альдегида.



Уксусный альдегид под воздействием восстановленной формы НАД(НАД·Н<sub>2</sub>), которая образовалась при окислении 3-фосфоглицеринового альдегида, восстанавливается в этанол:



Суммарная химическая реакция процесса спиртового брожения:



При спиртовом брожении образуются также небольшие количества уксусной, пропионовой, янтарной кислот и изобутилового, пропилового спиртов, глицерина, ацетона, диацетила и др. Так, бактерии *Sarcina ventriculi* и *Erwinia amylovora* сбраживают глюкозу до этанола и  $\text{CO}_2$  по гликолитическому пути с участием пируватдекарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы.

Кроме этанола и  $\text{CO}_2$  в небольших количествах образуются и побочные продукты: ацетат и молекулярный водород (*S. ventriculi*) и лактат (*E. amylovora*). У бактерий *Zymomonas mobilis*, используемых в Мексике для получения национального спиртового напитка «пульке», катаболизм глюкозы до пировиноградной кислоты идет по пути Энтнера-Дудорова. Дальнейшее превращение пирувата происходит с участием пируватдекарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы.

Выход продуктов брожения – по 2 молекулы этанола и  $\text{CO}_2$  на 1 молекулу сброженной глюкозы (как и при спиртовом брожении по гликолитическому пути), но энергетический выход в 2 раза ниже, чем при гликолизе: всего 1 молекула АТФ на 1 молекулу сброженной глюкозы.

Спиртовое брожение лежит в основе виноделия, пивоварения, производства спирта, хлебопечения, получения кваса и некоторых кисломолочных продуктов (кефира, кумыса и др.).

### Маслянокислое брожение

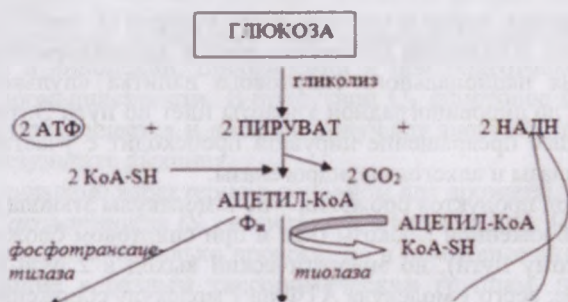
Маслянокислое брожение проходит в строго анаэробных условиях, и осуществляют его многие облигатно-анаэробные бактерии рода *Clostridium*, но типичными представителями являются *C. butyricum* и *C. pasteurianum*.

В основе маслянокислого брожения лежит сбраживание углеводов по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты, которая далее подвергается декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА.

Реакция катализируется ферментом пируват: ферредоксинокси-доредуктазой и является ключевой в маслянокислом брожении.

Основной продукт брожения – масляная кислота образуется в результате конденсации двух молекул ацетил-КоА. Превращения ацетил-КоА в масляную кислоту сопряжены с процессами восстановления, в которых в качестве доноров водорода используются молекулы НАДН, образующиеся ранее в процессе гликолиза. Кроме того, одна из молекул ацетил-КоА, присоединяя неорганический фосфат, может подвергаться фосфорилированию, превращаясь в ацетилфосфат и далее в ацетат, что сопровождается синтезом АТФ в процессе субстратного фосфорилирования. Осуществляется под действием спорообразующих бактерий рода *Clostridium* по схеме (рис. 16):

В результате деятельности маслянокислых бактерий *Clostridium kluyveri* возможен синтез масляной кислоты, уксусной или пропионовой кислоты из этанола. Механизм реакции связан с окислением этанола, который превращается в масляную кислоту.



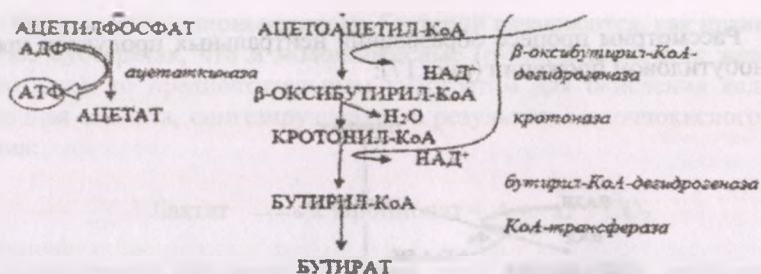


Рисунок 16 – Схема маслянокислого брожения у *Clostridium butyricum*

Маслянокислым брожением получают масляную кислоту, обладающую горьким вкусом и резким запахом. Она широко применяется в технике. Эфиры масляной кислоты имеют приятный запах цветов или фруктов и используются для приготовления ароматических эссенций в кондитерской промышленности при производстве газированных напитков, а также в парфюмерной промышленности (например, метиловый эфир с яблочным запахом, этиловый эфир с грушевым запахом, амиловый – с ананасовым).

Маслянокислые бактерии нередко причиняют и вред, вызывая порчу продуктов – прогоркание масла, сметаны, квашеных овощей, силоса, а также при недостаточной стерилизации – порчу консервированных грибных и мясных продуктов. Кроме того, многие клостридии патогенны и вызывают заболевания человека и животных.

### Ацетонобутиловое брожение

Некоторые клостридии (*Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. cellobioparum* и др.) при сбраживании углеводов наряду с кислотами накапливают в среде нейтральные продукты (бутиловый, изопропиловый, этиловый спирты, ацетон). Особенно много нейтральных продуктов образуется культурой *Clostridium acetobutylicum*, что дало основания в свое время выделить как вариант маслянокислого брожения ацетонобутиловое брожение.

Ацетонобутиловое брожение имеет двухфазный характер. В течение первой фазы наблюдается активный рост бактерий, в среде идет накопление преимущественно органических кислот (масляной и уксусной).

Во второй фазе брожения снижается pH среды, рост бактерий замедляется, преобладает синтез нейтральных продуктов – ацетона, буганола и этанола.

Рассмотрим процесс образования нейтральных продуктов при ацетонобутиловом брожении (рис. 17):

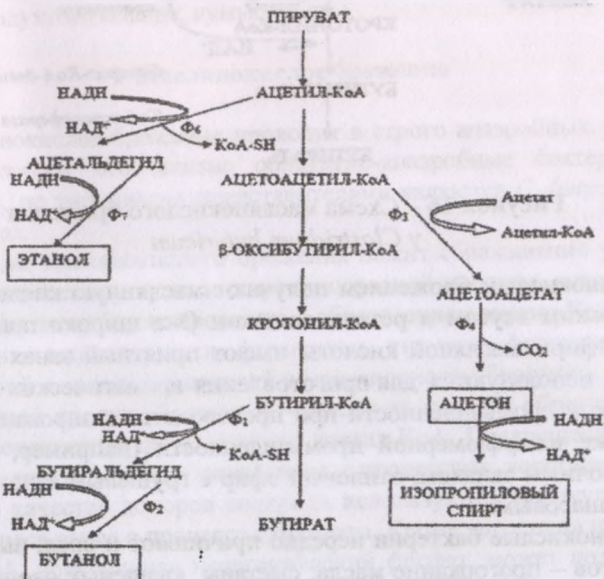


Рисунок 17 – Схема ацетонобутилового брожения:

Ф1 – бутиральдегиддегидрогеназа; Ф2 – бутанолдегидрогеназа;

Ф3 – КоА-трансфераза; Ф4 – ацетоацетатдекарбоксилаза;

Ф5 – изопропанолдегидрогеназа;

Ф6 – ацетальдегиддегидрогеназа; Ф7 – алкогольдегидрогеназа

Бактерии рода *Clostridium* используют в производстве масляной кислоты, необходимой для парфюмерной промышленности, а также для получения в промышленном масштабе ацетона и бутанола. Для производства этих продуктов используют картофель, зерно, мелассу и другое сырье, содержащее углеводы.

### Пропионовокислое брожение

Пропионовокислые бактерии расщепляют углеводы по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты, которая подвергается дальнейшим превращениям с образованием пропионовой кислоты, уксусной кислоты и  $\text{CO}_2$ .

Поскольку пропионовокислые бактерии развиваются, как правило, в тех же субстратах, что и молочнокислые (рубец и кишечник жвачных животных), то предпочтительным субстратом для окисления является молочная кислота, синтезирующаяся в результате молочнокислого брожения:



Существуют два метаболических пути образования пропионовой кислоты у пропионовокислых бактерий:

– акрилатный путь, в котором лактат в ходе ряда последовательных реакций восстанавливается до пропионата (рис. 18);

– сукцинат-пропионатный путь, в котором лактат превращается в пропионат через стадии образования пирувата и сукцината (рис. 19).

Акрилатный путь присущ, по-видимому, только нескольким видам микроорганизмов (*Clostridium propionicum*, *Bacteroides ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*). Субстратами для данного метаболического пути могут служить L-, D-, или LD-формы лактата.

В клетках указанных бактерий присутствует фермент рацемеза, катализирующий взаимопревращения стереоизомеров. L-лактат превращается в L-лактил-КоА, который в результате пока еще не изученных детально реакций превращается в акрилоил-КоА.

В свою очередь акрилоил-КоА восстанавливается до пропионил-КоА с дальнейшим образованием пропионата.

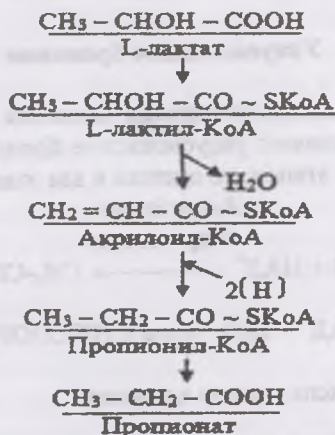


Рисунок 18 – Акрилатный путь

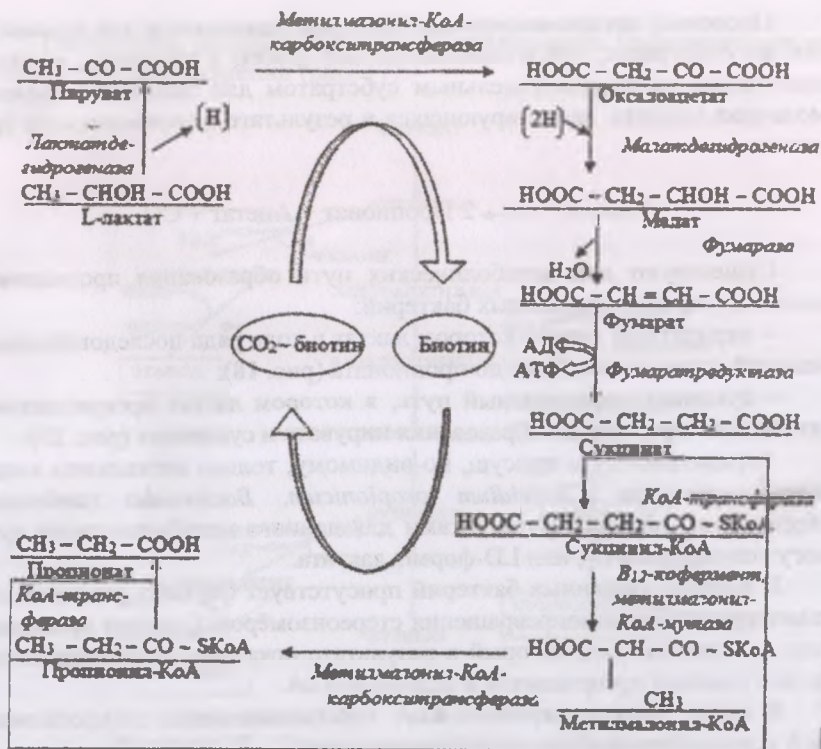


Рисунок 19 – Метилмалонил-КоА путь

### Уксуснокислое брожение

Примером таких микроорганизмов являются уксуснокислые бактерии, которые осуществляют уксуснокислое брожение, окисляя первичные спирты, такие как этанол, до ацетата в два этапа:

Алкогольде-  
гидрогеназа



Вторичные спирты окисляются до кетонов:



Многоатомные спирты, являющиеся производными сахаров, окисляются этими бактериями в альдозы и кетозы, например: сорбит → сорбоза; глицерин → диоксиацетон. Альдозы и кетозы могут далее окисляться в соответствующие кислоты.

**Метановое брожение** в природе происходит в заболоченных водах. Органические соединения белки, углеводы, жиры, которые присутствуют в биомассе, начинают распадаться на простейшие органические соединения аминокислоты, сахара, жирные кислоты под действием гидролитических ферментов.

Метановое брожение используется в промышленных и бытовых очистных сооружениях для обезвреживания органических веществ сточных вод. Образующийся при этом метан, главным образом в смеси с  $\text{CO}_2$  используется как топливо.

### Контрольные вопросы:

- 1 Какие основные физико-химические процессы протекают при производстве кисломолочных продуктов?
- 2 Опишите процессы спиртового, молочнокислого, маслянокислого и уксуснокислого брожения.
- 3 Использование различных типов брожения в промышленности и сельском хозяйстве.

## ТЕМА 5. ГРИБЫ КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

### Общая характеристика грибов

Наряду с прокариотическими микроорганизмами, к которым относятся бактерии, существует несколько групп эукариотных микроорганизмов. К эукариотным микроорганизмам относятся организмы, имеющие эукариотный тип строения клеток и обладающие микроскопическими размерами. К эукариотным микроорганизмам относятся простейшие, микроскопические водоросли и грибы. Наибольшее значение в природе и жизни человека из эукариотных микроорганизмов имеют грибы.

Со времен К. Линнея (1735) грибы на основе ряда значимых признаков традиционно относили к царству растений. Однако уже в XIX веке многие ботаники указывали на существенные отличия грибов от растений, и Э. Фриз в 1831 г. предложил выделять грибы в самостоятельное царство органического мира. В эволюционной системе живого мира, предложенной Р. Х. Уиттейкером, грибы выделяются в отдельное царство. Согласно эволюционной схеме Уиттейкера животные, растения и грибы представляют три эволюционные линии, возникшие из протистов и отличающиеся по способам питания: зоотрофному – у животных, автотрофному – у растений и осмотрофному – у грибов.

Грибы – обширная группа организмов, включающая около 100 тысяч видов (по мнению некоторых микологов, например, Д. Хоксворта, истинное число видов грибов составляет не менее 1,5 млн). Они широко распространены по всему земному шару и встречаются на суше, в воде, внутри многих растений и животных и т. п.

При традиционном делении всех живых организмов на две большие группы – царство растений и царство животных – грибы рассматриваются как один из отделов *Mycota*, или *Fungi* растительного царства.

Однако сейчас считается более правильным выделять грибы в качестве самостоятельного царства живой природы, отличающегося как от растений, так и от животных.

Характерной особенностью грибов является хорошо выраженная плотная клеточная стенка. Клеточная стенка грибов на 80–90 % состоит из содержащих азот и безазотистых полисахаридов. Клеточные стенки гиф большинства грибов включают хитин – азотсодержащий полисахарид, состоящий из субъединиц N-ацетилглюкозамина. Важными особенностями грибов являются способность их мицелия к неограниченному апикальному росту, неподвижный прикрепленный образ жизни,

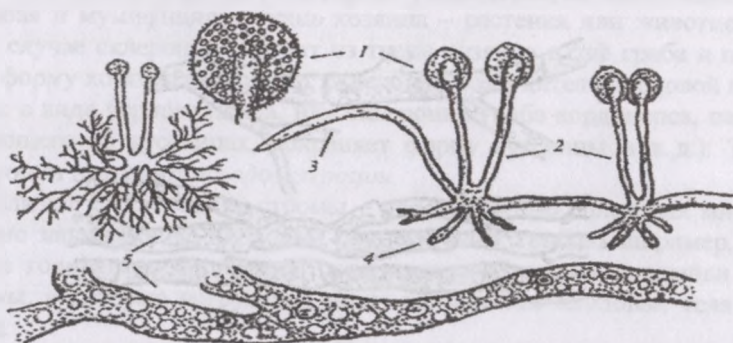
осмотрфный тип питания, а также размножение при помощи спор. Грибы лишены хлорофилла, не способны к фотосинтезу и требуют для питания готовое органическое вещество – поэтому они являются гетеротрофными организмами.

Грибам можно дать следующее определение: *грибы – это эукариотные гетеротрофные организмы, питающиеся осмотрфно.*

Осмотрфное питание означает, что грибы абсорбируют питательные вещества из окружающей среды всей поверхностью своего вегетативного тела.

Грибы – талломные или слоевищные, организмы. Их вегетативное тело состоит из тонких, не более нескольких микрон толщиной, нитевидных образований, называемых *гифами*, обильно разветвленная система которых формирует *грибницу*, или *мицелий*.

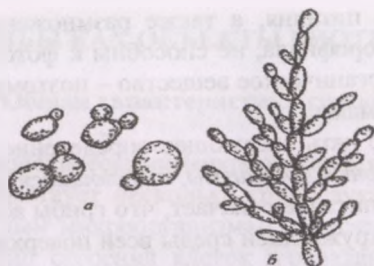
У низших грибов мицелий неклеточный, представляет собой как бы одну гигантскую клетку, лишённую перегородок с большим количеством ядер (рис. 20).



**Рисунок 20** – Строение таллома муконовых грибов (*Mucorales*) класса зигомизеты:

1 – спорангий со спорангиоспорами; 2 – спорангиеносцы; 3 – столоны; 4 – ризоиды; 5 – многоядерный несептированный мицелий

В цикле развития дрожжевых грибов (класс *Endomycetes*, порядок *Endomycetales*) обязательно присутствует стадия бесполого размножения, во время которой образуется *почкующийся мицелий* (рис. 21). У некоторых видов при определенных условиях среды вновь образовавшиеся клетки не отделяются от материнских, а оставаясь прикрепленными к ним, в свою очередь делятся, образуя псевдомицелий из цепочек и даже веточек клеток.



**Рисунок 21** – Почкующийся мицелий:  
(а) псевдомицелий (б) дрожжевых грибов

Настоящие грибы отделов аскомикота и базидиомикота (высшие грибы) имеют хорошо выраженный *септированный мицелий* разделенный перегородками (септами) на отдельные клетки, содержащие одно или несколько ядер (рис. 22).



**Рисунок 22** – Септированный мицелий:  
а – без пружек; б – с пружками

Существуют и немиецелиальные грибы. У части хитридиевых и у гифохитридиевых, являющихся в основном внутриклеточными паразитами водорослей и водных грибов, таллом одноклеточный, микроскопический, иногда даже лишенный в вегетативном состоянии клеточной стенки, которая образуется только при формировании репродуктивных органов. Клетка бывает сферической, эллипсоидальной или неправильной формы размером от нескольких микрометров до нескольких сотен микрометров по большему диаметру. У некоторых грибов из этих групп от такой клетки отходят тонкие разветвленные нитевидные структуры, лишенные собственных ядер, *ризомицелий*.

Ризомицелий можно рассматривать как зачаточный мицелий, эволюционную ступень к настоящему неклеточному мицелию. При образовании ризомицелия может развиваться только одна клетка, содержащая ядро, которая в дальнейшем становится центром образования ризомицелия и развития репродуктивных органов. Они выполняют проводящие функции. Гифы их наружных слоев имеют утолщенные, часто темно-окрашенные стенки и выполняют защитные функции, а внутренние тонкостенные гифы – проводящие.

Другой тип видоизменений мицелия – распространенные у многих групп грибов *склероции* – плотные переплетения мицелия, служащие для перенесения неблагоприятных условий. Обычно склероции темно окрашенные, так как наружные слои клеток толстостенные и пигментированные, а внутренние – тонкостенные, светлоокрашенные и богатые запасными питательными веществами (например, склероции возбудителя белой гнили овощных культур или черно-фиолетовый рожок спорыньи в колосе ржи). Некоторые грибы образуют склероции, пронизывая и мумифицируя ткань хозяина – растения или животного. В этом случае склероции состоит из ткани хозяина и гиф гриба и повторяет форму хозяина (например, склероции возбудителя плодовой гнили яблوك в виде черного плода, или склероции гриба кордицепса, паразитирующего на гусеницах, сохраняет форму гусеницы и т. д.). Такие склероции называются *псевдосклероции*.

Близки к склероциям стромы – менее плотные сплетения мицелия, обычно защищающие плодовые тела сумчатых грибов, например, оранжевые головки на проросшем склероции возбудителя спорыньи – это стромы, в которые погружены микроскопические плодовые тела этого гриба.

У многих грибов есть структуры, выполняющие проводящие функции. Это *мицелиальные тяжи* и *ризоморфы*. Мицелиальные тяжи состоят из гиф, расположенных параллельно и местами плотно прижатых друг к другу. Между отдельными гифами могут быть мицелиальные мостики, *анастомозы*. На мицелиальных тяжах, находящихся в почве, формируются зачатки, а затем и сами плодовые тела шляпочных грибов. Тяжи всегда можно найти на основаниях ножек шляпочных грибов. Хорошо развитые тяжи, у которых наружные гифы имеют утолщенные, обычно темно окрашенные стенки, выполняющие защитную функцию, и внутренние – тонкостенные, выполняющие собственно проводящую функцию, называются *ризоморфами*. Их толщина 4–7 мм, а в длину они могут достигать нескольких метров, что способствует распространению гриба по субстрату. Такие ризоморфы известны у настоящего домового

гриба – активнейшего разрушителя деревянных построек и у опёнка осеннего, у которого они и были впервые описаны.

При плотном переплетении гиф у грибов образуется ложная ткань, *плектенхима*. Из такой ткани состоят плодовые тела шляпочных грибов. Плектенхима отличается (по происхождению и строению) от настоящей ткани *паренхимы*, которая возникает в результате деления клеток. Настоящая ткань встречается у грибов очень редко, например, в группе паразитирующих на насекомых лабульбениевых грибов из класса сумчатых таллом состоит из настоящей паренхимы.

На мицелии развиваются органы размножения грибов. В отличие от мицелия они крайне разнообразны по морфологии. Их строение служит основой современной систематики грибов.

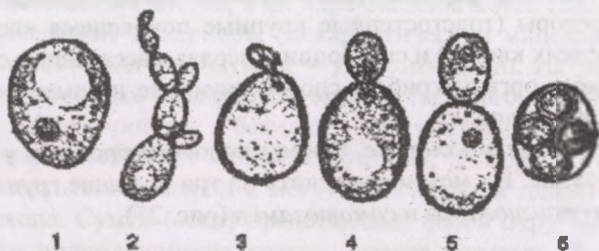
Клетка гриба имеет типичное эукариотическое строение. Особенности клеточного строения: основной запасной полисахарид – гликоген; имеет (как правило) хорошо выраженную клеточную стенку, в составе которой присутствуют микрофибриллы хитина. Пластид и крупных вакуолей нет. Для многих представителей грибов характерна дикариотическая фаза развития: в клетке располагаются два гаплоидных генетически различных ядра, которые могут сливаться.

Большинство грибов имеет микроскопические размеры. В природе на естественных субстратах – в воде, в почве, на растительных остатках, на живых растениях и животных и т. д. – такие грибы часто нельзя обнаружить невооруженным глазом или же мы видим их как мелкие дернинки, пятна или налеты различной окраски. Зато часто можно увидеть результаты их деятельности, например патологические изменения у растений или животных, повреждение или разрушение различных материалов и изделий и т. п. Такие грибы, имеющие микроскопически малые размеры, называют микромицетами.

### Размножение грибов

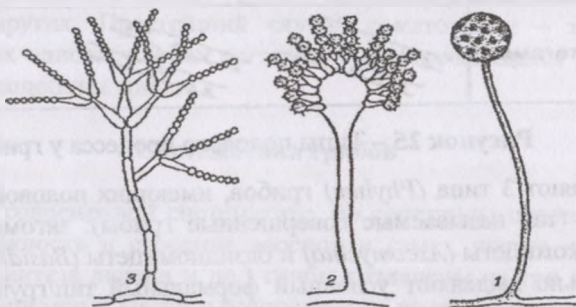
У грибов различают вегетативное, бесполое и половое размножение.

*Вегетативное размножение* может осуществляться фрагментами мицелия, которые, отделяясь, дают начало новому мицелию. У дрожжевых грибов вегетативное размножение происходит путем почкования (рис. 23). Процесс почкования состоит в том, что на клетках дрожжей образуются выросты (почки), постепенно увеличивающиеся в размерах. Такие почки отделяются от материнской клетки или сохраняют с ней связь, в результате чего образуются своеобразные цепочки клеток.



**Рисунок 23** – Дрожжи: 1 – отдельная клетка; 2–5 – почкование клеток; 6 – сумка с четырьмя аскоспорами

*Бесполое размножение* происходит при помощи специализированных клеток или многоклеточных структур – спор, которые прорастают в мицелий. Такие споры образуются на мицелии эндогенно, внутри особыхместилищ – спорангиев, или экзогенно, на поверхности специализированных веточек мицелия – конидиеносцах (рис. 24).



**Рисунок 24** – Органы размножения плесневых грибов: 1 – спорангий мукора; 2 – конидии аспергилла; 3 – конидии пеницилла

Эндогенные споры грибов могут быть двух типов. Зооспоры – голые подвижные клетки, снабженные жгутиками. Они формируются внутри зооспорангиев. Спорангиоспоры – неподвижные споры, одетые оболочкой. Экзогенные споры всегда неподвижны, покрыты оболочкой. Их называют конидиями.

Основные типы конидий: артроконидии (артроспоры), или таллоконидии образуются путем равномерного септирования и расчленения гиф; бластоконидии образуются в результате почкования. Одноклеточные небольшие конидии называются микроконидиями. Многоклеточные, большие конидии называются макроконидиями.

К бесполом формам грибов относят также хламидоконидии, или хламидоспоры (толстостенные крупные покоящиеся клетки или комплекс мелких клеток) и склероции (твердая масса клеток с оболочкой) – покоящиеся органы грибов, способствующие их выживанию в неблагоприятных условиях.

**Половое размножение.** Формы полового процесса у грибов очень разнообразны. Их можно разделить на три большие группы: *гаметогамия*, *гаметангиогамия* и *соматогамия* (рис. 25).

	изогамия	гетерогамия	оогамия
Гаметогамия			
Гаметангиогамия (ангиогамия)			
Соматогамия			

Рисунок 25 – Типы полового процесса у грибов

Выделяют 3 типа (*Phylum*) грибов, имеющих половой способ размножения (так называемые совершенные грибы): зигомицеты (*Zygomycota*) аскомицеты (*Ascomycota*) и базидиомицеты (*Basidiomycota*).

Отдельно выделяют условный формальный тип/группу грибов – дейтеромицеты (*Deiteromycota*) у которых имеется только бесполой способ размножения (так называемые несовершенные грибы).

**Гаметогамия** – слияние специальных половых клеток (гамет), образующихся в гаметангиях. Основные типы гаметогамии – *изогамия* (слияние не различающихся по размерам и морфологии гамет), *гетерогамия* (слияние подвижных гамет, различающихся по размерам), *оогамия* (слияние крупной неподвижной яйцеклетки с мелким подвижным сперматозоидом или антеридием – мужским половым органом, не дифференцированным на гаметы).

**Гаметангиогамия** – слияние двух специализированных половых структур (*гаметангиев*), не дифференцированных на гаметы. Этот тип полового процесса распространен у зигомицетов и аскомицетов.

После оплодотворения образуется зигота, прорастающая либо после некоторого периода покоя, либо непосредственно после образования. У аскомицетов и базидиомицетов при образовании зиготы слива-

ется только цитоплазма клеток, а их ядра располагаются попарно, образуя так называемые дикарионы (дикариотический мицелий – у базидиомицетов или аскогенные гифы – у аскомицетов). На развивающихся из зиготы гифах образуются органы полового размножения: сумки (аски). У аскомицетов и базидий – у базидиомицетов. Сумки и базидии – микроскопически мелкие структуры, размеры которых не превышают нескольких микрон и могут быть видимы только с помощью микроскопа. Сумки (аски) представляют собой округлые, булавовидные или цилиндрические клетки, внутри которых образуются споры, называемые аскоспорами. Базидиями называются клетки цилиндрической или булавовидной формы или структуры, состоящие из двух-четырех клеток. На их поверхности на тонких ножках, называемых стеригмами, экзогенно образуются споры (базидиоспоры). Сумки и базидии часто образуются не на мицелии, а на специальных плодовых телах разнообразного строения.

*Соматогамия* – это слияние обычных вегетативных клеток мицелия. Она встречается у многих грибов, например у базидиомицетов, и некоторых других. Простейший случай соматогамии – *хологамия* (слияние двух одноклеточных организмов), встречающаяся у некоторых дрожжеподобных грибов.

### Систематика грибов

Согласно современной систематике, по сочетанию основных признаков (подвижность и строение зооспор и гамет, состав клеточной стенки, путь синтеза лизина и др.) грибы разделены на три самостоятельные эволюционные линии и распределены по трем царствам живой природы.

В царство *Protozoa* включены организмы, объединенные в группу миксомицетов. Часть примитивных грибов предложено рассматривать в качестве отдельного царства грибоподобных организмов – *Chromista*. Представители этого царства имеют митохондрии с трубчатыми кристами, перистые жгутики с трехчленными жгутиковыми волосками, в состав их клеточной стенки входит целлюлоза, а хитин и  $\beta$ -глюкан отсутствуют.

### Царство Настоящих грибов

Царство Настоящие грибы объединяет организмы, в состав клеточной стенки которых входит хитин в сочетании с  $\beta$ -глюканом, маннаном или с хитозаном. Подвижные стадии (зооспоры, гаметы) в цикле

развития у подавляющего большинства настоящих грибов отсутствуют (имеются только у представителей отдела хитридиомикота), биосинтез лизина идет через  $\alpha$ -аминоадипиновую кислоту.

Царство Настоящих грибов разделяют на крупные таксономические группы – отделы – главным образом на основе того, каким образом у них осуществляется половое размножение.

Основными отделами грибов являются *Chytridiomycota* (около 500 видов), *Zygomycota* (около 1000 видов), *Ascomycota* (около 30 тыс. видов), *Basidiomycota* (около 30 тыс. видов) и *Deuteromycota* (около 30 тыс. видов).

На основании типов полового процесса, характера жгутикования у подвижных стадий (зооспор и гамет), развития спор полового размножения и других признаков грибы подразделяют на основные классы.

Хитридиомицеты (*Chytridiomycetes*). Мицелий этих грибов развит слабо или отсутствует. Зооспоры и гаметы с одним задним бичевидным жгутиком.

Гифохитриомицеты (*Hyphochytriomycetes*). Мицелий развит слабо или отсутствует. Зооспоры и гаметы с одним передним перистым жгутиком.

Оомицеты (*Oomycetes*). Мицелий хорошо развит, неклеточный. Зооспоры с двумя неодинаковыми жгутиками – перистым и бичевидным. Половой процесс – оогамия.

Зигомицеты (*Zygomycetes*). Мицелий хорошо развит, за немногими исключениями неклеточный. Подвижные стадии отсутствуют. Бесполое размножение у большинства видов с помощью неподвижных спорангиоспор, образуемых внутри спорангиев. Реже – с образованием конидий. Половой процесс – зигогамия (слияние двух гаметангиев, по строению хорошо отличимых от вегетативных гиф, на которых они образуются) (рис. 26).

При бесполом размножении зигомицет на плодоносящем гифе (спорангиеносце) образуется спорангий – шаровидное утолщение с оболочкой, содержащие многочисленные спорангиоспоры.

Половое размножение у зигомицет происходит с помощью зигоспор.

Зигомицеты относятся к низшим грибам (мицелий несептированный). Они включают представителей родов *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia*, *Basidiobolus*, *Conidiobolus*. Распространены в почве и воздухе. Могут вызывать зигомитоз (мукомормикоз) легких, головного мозга и других органов человека.

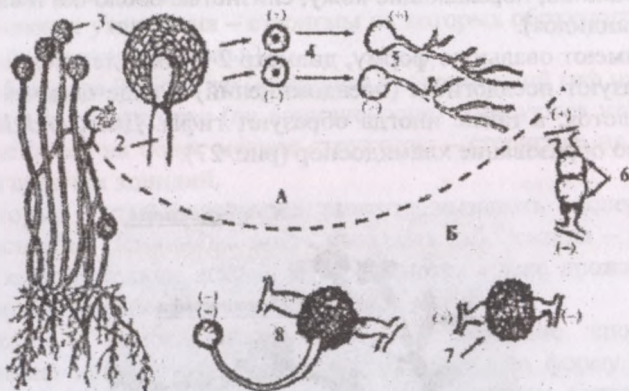


Рисунок 26 – Жизненный цикл мукоора:

- А – бесполое размножение; Б – половой процесс по типу зигогамии;  
 1 – нечленистый мицелий; 2 – спорангиеносец; 3 – спорангий;  
 4 – споры; 5 – прорастание (+) и (-) спор; 6 – гаметангии (+) и (-) мицелиев; 7 – зигоспора; 8 – проросшая зигоспора

**Аскомицеты** (*Ascomycetes*) (*сумчатые грибы*). Мицелий хорошо развит, клеточный. Подвижных стадий нет. Бесполое размножение с помощью конидий. Половой процесс – гаметангиогамия. Споры полового размножения образуются эндогенно, в сумках. Имеют септированный мицелий (кроме одноклеточных дрожжей). Свое название они получили от основного органа – сумки, или аска, содержащего 4 или 8 гаплоидных половых спор (аскоспор). К аскомицетам относятся отдельные представители (телеоморфы) родов *Aspergillus* и *Penicillium*.

**Базидиомицеты** (*Basidiomycetes*) (*шляпочные грибы*). Мицелий хорошо развит, клеточный (обычно дикарионичный). Подвижных стадий нет. Бесполое размножение с помощью конидий. Половой процесс – соматогамия. Споры полового размножения образуются экзогенно, на базидиях. Имеют септированный мицелий. Они образуют половые споры – базидиоспоры путем отшнуровывания от базидия – концевой клетки мицелия, гомологичной аску. К базидиомицетам относятся некоторые дрожжи, например, телеоморфы *Styptosoccus neofortmans*.

**Дейтеромицеты** (*Deuteromycetes, Fungi imperfecti*) (несовершенные грибы). Мицелий хорошо развит, клеточный. Размножение только вегетативным и бесполом путем, в последнем случае с помощью конидий. Являются типом грибов, который объединяет грибы, не имеющие полового размножения. Образуют септированный мицелий, размножаются формированием конидий. К дейтеромицетам относятся несовершенные дрожжи (дрожжеподобные грибы), например, некоторые гри-

бы рода *Candida*, поражающие кожу, слизистые оболочки и внутренние органы (кандидоз).

Они имеют овальную форму, диаметр 2–5 мкм, делятся почкованием и образуют псевдогифы (псевдомицелий) в виде цепочек из удлиненных клеток, а также иногда образуют гифы. Для *Candida albicans* характерно образование хламидоспор (рис. 27).

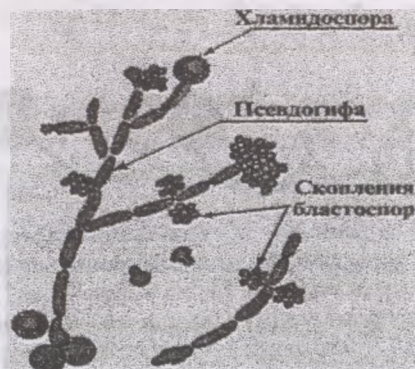


Рисунок 27 – Грибы *Candida albicans*

### Грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium*

Большинство грибов родов *Aspergillus*, являются анаморфами, т.е. размножаются только бесполом путем, с помощью бесполой спор – конидий (рис. 28) и должны быть отнесены по этому признаку к несовершенным грибам.

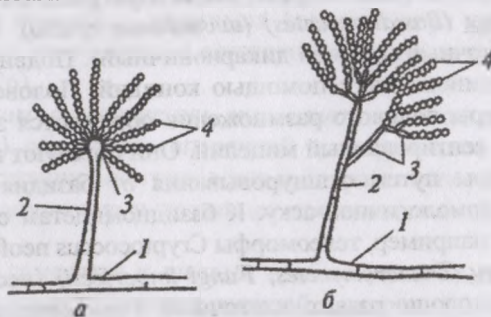


Рисунок 28 – Конидиеносцы у грибов рода *Aspergillus* (а) и *Penicillium* (б): 1 – вегетативный мицелий; 2 – конидиофор; 3 – стеригмы; 4 – конидии

У грибов рода *Aspergillus* на концах плодоносящих гиф, конидиеносцах, имеются утолщения – стеригмы на которых образуются цепочки конидий («леечная плесень»).

У грибов рода *Penicillium* (кистевик) плодоносящий гиф напоминает кисточку, так как из нее (на конидиеносце) образуются утолщения, разветвляющиеся на более мелкие структуры – стеригмы, на которых находятся цепочки конидий.

Некоторые виды аспергилл могут вызывать аспергиллезы и афлатоксикозы. Пенициллы могут вызывать заболевания – пенициллиозы. Представителями аскомицетов являются также дрожжи (роды *Saccharomyces*, телеоморфы многих видов *Candida*).

Дрожжи – одноклеточные грибы, утратившие способность к образованию истинного мицелия; имеют овальную форму клеток с диаметром 3–15 мкм. Они размножаются почкованием, бинарным делением на две равные клетки или половым путем с образованием аскоспор. Заболевания, вызываемые некоторыми видами дрожжей, получили название дрожжевых микозов.

К аскомицетам относится и возбудитель эрготизма спорынья (*Claviceps purpurea*), паразитирующий на злаках.

Многие виды аскомицетов являются продуцентами антибиотиков, используются в биотехнологии.

### Экологические группы грибов

В зависимости от среды обитания и питающих субстратов грибы разделяют на ряд экологических или эколого-трофических групп. Разные экологические группы грибов адаптированы к обитанию на разных питательных субстратах в определенных условиях окружающей среды, что позволяет им устойчиво развиваться или даже доминировать в этих эконисах. Появление экологических групп грибов явилось результатом длительной взаимосвязанной эволюции грибов и других организмов, происходившей во взаимосвязи с изменениями условий их среды обитания. Наиболее обширными и важными с экологической точки зрения являются группы ксилотрофов, подстилочных и почвенных сапротрофов и микоризных грибов.

**Ксилотрофные грибы.** К группе ксилотрофов, или дереворазрушающих, относятся грибы, обитающие на древесине и использующие ее в качестве питательного субстрата. Главная отличительная черта ксилотрофов заключается в том, что они не просто способны обитать на древесине, но они разрушают ее основу – лигноцеллюлозный комплекс. Этой способностью обладают в основном только некоторые грибы отде-

ла *Basidiomycota*, которые поэтому называют ксилотрофные, или дереворазрушающие базидиомицеты.

**Подстилочные и почвенные сапротрофы.** Весьма многочисленными являются группы подстилочных и почвенных грибов-сапротрофов, которые обеспечивают минерализацию растительных остатков в лесной подстилке и в почве

**Микоризные грибы.** Особую группу составляют микоризные грибы, которые образуют микоризу. Микориза – это симбиоз корней высших растений с мицелием грибов. Микоризные грибы играют важнейшую роль в нормальном развитии лесных деревьев и травянистых растений.

**Патогенные грибы.** Многие грибы являются возбудителями болезней человека и животных – микозов. Эти грибы объединяют в группу патогенных грибов. На сегодняшний день известно около 400 болезнетворных, т. е. патогенных грибов.

### Культивирование грибов

Культуральное исследование направлено на выделение чистой культуры гриба и ее идентификацию.

Посевы можно проводить на плотные и жидкие питательные среды (Сабуру, кукурузный, рисовый, картофельный агары).

Культивирование грибов осуществляется при 22–28°C в течение 2–4 недель.

Если грибы оказались в смешанных культурах, то их чистые культуры получают после расщепов до изолированных колоний на кровяном агаре или после обработки соляной кислотой (для уничтожения бактерий).

Выделенные чистые культуры грибов идентифицируют по внешнему виду и форме колоний, их консистенции, цвету, расположению конидиеносцев, спор, а также по биохимическим признакам.

### Значение грибов в природе и жизни человека

Грибы наряду с прокариотами играют большую роль в природе и жизни человека. Они присутствуют во всех экологических нишах – в воде и на суше, в почве и на всевозможных субстратах. Наряду с бактериями грибы как редуценты выполняют основную работу по деградации мертвых органических остатков и, таким образом, играют ключевую роль в глобальном круговороте углерода. Разлагая органические остатки, грибы вместе с бактериями участвуют в почвообразовательном процессе.

Грибы участвуют в разнообразных симбиозах. Образую мутуалистические симбиозы с корнями растений (микоризу), обеспечивают нормальный рост и продуктивность растений, также образуют симбиозы с микроскопическими водорослями и цианобактериями в лишайниках, вступают в симбиотические взаимоотношения с насекомыми, способствуя усвоению ими лигноцеллюлозных субстратов.

Грибы являются обязательным компонентом пищеварительной системы жвачных и некоторых других травоядных млекопитающих, где они играют важную роль в переваривании растительной пищи.

### Использование грибов в биотехнологии

Грибы нашли в биотехнологии широкое и разнообразное применение. Грибы продуцируют разнообразные антибиотики, которые нашли практическое применение. Например, бета-лактамы антибиотики грибного происхождения, такие как пенициллины и цефалоспорины, широко применяемые в медицине. В первую очередь это продуценты антибиотиков – актиномицеты (*Streptomyces*, *Micromonospora*) и пенициллы. Пенициллины производят плесневые грибы рода *Penicillium* (открыты в 1940 г.), стрептомицин производят некоторые виды *Actinomyces griseus* (препарат был предложен в 1944 г. С. Ваксманом), цефалоспорины производят некоторые виды грибов рода *Cephalosporium* и другие. Грибные антибиотики из группы циклоспоринов оказались высокоактивными иммунодепрессантами, используются в трансплантологии.

**Пищевая промышленность.** Плодовые тела многих шляпочных грибов являются деликатесным продуктом питания. Дрожжевые грибы используют в пивоварении, виноделии, хлебопечении, а также при производстве этилового спирта. Некоторые грибы используют при изготовлении особых видов сыров (рокфор, камамбер, бри и др., рис. 29).



Рисунок 29 – Сыры рокфор и камамбер

Дрожжи давно заняли свою нишу в пищевой промышленности. Это производство спиртных напитков и хлеба (*Saccharomyces cerevisiae*), пищевой белок (*Saccharomycopsis lipolytica*), каротиноид астаксантин (*Phaffia rhodozyma*). Также немислима пищевая промышленность и без плесневых грибов. И это не только сыры с плесенью, хотя в сыроделии пенициллы широко используются.

Плесневые грибы сбраживают сою, рис, солод, пшеницу, производя соевый соус (*Aspergillus oryzae*), sake, ферментированные бобы. Получают из них и органические кислоты, и промышленные ферменты (амилаза, пектиназа).

**Промышленное культивирование съедобных грибов.** Мировое производство съедобных грибов составляет 3 млн 500 тыс. тонн в год. В настоящее время более чем в 70 странах промышленно культивируется более 20 различных видов грибов. Ведущими грибоводческими странами являются Китай – 1 млн 608 тыс. тонн, США – 363,5 тыс. тонн; Голландия – 240 тыс. тонн, Польша – 180 тыс. тонн.

Мировое производство шампиньона двухспорового превышает 1,5 млн тонн в год. Из дереворазрушающих грибов наиболее часто культивируют вешенку обыкновенную. Очень ценным грибом для искусственного выращивания является шиитаке (рис. 30).

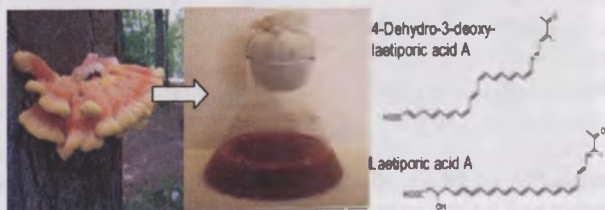


Рисунок 30 – Промышленное культивирование съедобных грибов:  
1 – *Agaricus bisporus* (шампиньон двухспоровый); 2 – *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная); 3 – *Lentinus edodes* (шиитаке)

**Медицина.** Многие грибы являются активными продуцентами физиологически активных веществ и используются для получения лекарственных средств и БАД. БАДы на основе грибов содержат уникальные комплексы биологически активных веществ: полисахариды, каротиноиды, фенольные соединения, ненасыщенные жирные кислоты. Они предназначены для восполнения витаминной и минеральной недостаточности, уменьшения отрицательного воздействия неблагоприятных экологи-

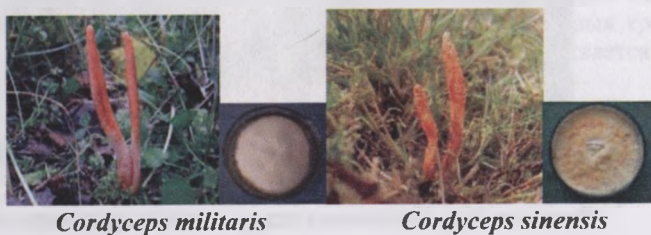
ческих факторов, выведения из организма радионуклидов, тяжелых металлов, эндотоксинов.

Штаммы гриба трутовика серно-желтого *Laetiporus sulphureus*, являются продуцентами пигмента полиеновой природы – летипороксантина. Выращивание гриба на жидких питательных средах методом глубинного культивирования позволяет за короткий промежуток времени получать грибную биомассу с более высоким содержанием пигмента (до 10–15 мг/г) по сравнению с плодовыми телами (2–3 мг/г). На основе мицелия серно-желтого трутовика *Laetiporus sulphureus* разработана лечебно-профилактическая кормовая добавка Липокар (рис. 31). Она предназначена для применения в промышленном птицеводстве как иммуностимулирующее, антиоксидантное, антистрессорное и детоксицирующее средство, а также для обогащения продуктов птицеводства (яиц, мяса птиц и т. д.) каротиноидами.



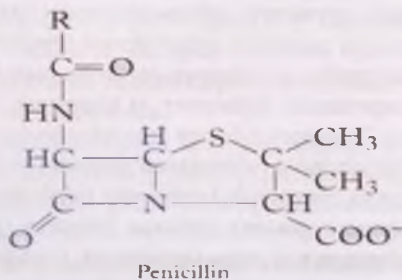
**Рисунок 31** – Получение липокаротиноидного комплекса гриба *Laetiporus sulphureus*

При культивировании грибы рода *Cordyceps* за 2–3 суток роста образуют до 15–20 г/л биомассы с содержанием 10–17% полисахаридов и 1,5–4,5 г/л внеклеточных полисахаридов (рис. 32). Глубинный мицелий грибов рода *Cordyceps* также содержит: общие углеводы – 40–44%, белок – 20–32,5, липиды – 5,5–7,6%, фосфолипиды – 3,0–3,8%, фенольные соединения – 700–2000 мг. Антиоксидантная активность составляет 75–90% по отношению к ионулу.



**Рисунок 32** – Культивирование грибов рода *Cordyceps*

Грибы рода *Penicillium* – продуценты пенициллина.



**Микробиологическая промышленность.** Грибы используют в микробиологической промышленности для производства белковой биомассы, ферментов, витаминов, органических кислот и ряда других биологически активных веществ.

**Экология.** Грибы используют для создания новых экологически чистых энергосберегающих биотехнологий, которые должны прийти на смену традиционным технологиям, наносящим вред окружающей среде. Например, технология биопульпирования – предобработка измельченной древесной массы специальными грибами или их ферментами позволяет избирательно удалять лигнин при производстве целлюлозы (рис. 33). Такая технология является не только экологически совместимой, но также позволяет экономить до 30 % энергии при производстве целлюлозы, то есть является энергосберегающей.



Рисунок 33 – Испытания технологии биопульпирования

*Микоремедиация* – направление биоремедиации, при котором очистка окружающей среды от загрязняющих агентов и восстановление окружающей среды осуществляется за счет метаболической активности грибов, поэтому грибы могут быть использованы для биоремедиации, то есть для защиты и направленного очищения окружающей среды (рис. 34).

Некоторые грибы обладают исключительной способностью разрушать самые разнообразные устойчивые к биодegradации органические вещества, загрязняющие окружающую среду.



**Рисунок 34** – Микоремедиация с помощью грибов

*Рециклизация – утилизация мусора.* В мире ежегодно образуется огромное количество бытового мусора и отходов сельского и лесного хозяйства. Избавляться от отходов следует, с одной стороны, как можно меньше загрязняя окружающую среду, а с другой – извлекая из них как можно больше энергии и углерода органических соединений.

В настоящее же время отходы чаще всего сжигают или захоранивают необработанными, не получая в последнем случае даже тепловой энергии.

Однако возможны альтернативные подходы на основе использования грибов в сочетании с другими микроорганизмами. Один из путей рециклизации – разведение на древесных отходах съедобных грибов и кормовых дрожжей, но в общей сложности так перерабатывается не более 2% органических отходов.

Для разложения целлюлозы и лигнина предпочтительнее использовать именно грибы, т.к. активности содержащихся в них ферментов – целлюлаз и лигниназ – выше, чем у ферментов бактерий, особенно в кислой среде, которая свойственна древесным отходам (бактерии предпочитают слабощелочную среду).

## Вредная деятельность грибов

Паразитируя на растениях и животных, некоторые грибы вызывают у них заболевания называемые – *микозами*. Примерами грибных болезней растений являются ржавчина, головня, спорынья, фузариоз, парша, фитофтороз, мучнистая роса и др. болезни, нанося тем самым огромный ущерб сельскому хозяйству и пищевой промышленности. Поселяясь на сельскохозяйственных продуктах, сырье и полуфабрикатах, грибы могут вызывать их порчу и даже интоксикацию.

Грибы могут вызывать плесневение стен и потолков в жилых помещениях, вызывая аллергические заболевания или даже микозы. Действуя как редуценты, грибы приносят большой вред, повреждая различные промышленные материалы и изделия.

Доля повреждения грибами всех производимых человечеством пластмасс превышает 25 %. Дереворазрушающие грибы вызывают болезни и гибель живых деревьев, а также вызывают порчу деловой древесины. Домовые грибы разрушают древесину в зданиях.

### ***Контрольные вопросы:***

- 1 Перечислите способы размножения грибов.
- 2 Какие экологические группы грибов Вы знаете?
- 3 Назовите области применения мицелиальных грибов (получение антибиотиков, ферментов, органических кислот и др.).
- 4 Перечислите группы дереворазрушающих грибов.
- 5 Что такое микоремедиация?

## ТЕМА 6. ВОДОРОСЛИ КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

### Общая характеристика водорослей. Структура таллома.

Водоросли представляют собой сборную группу преимущественно водных организмов. Характерной особенностью всех водорослей является то, что их тело не расчленено на вегетативные органы (корень, стебель, лист), а представлено талломом, или слоевищем. По этой причине их называют *талломными, или слоевищными организмами*. В отличие от высших растений у них обычно отсутствуют ткани, а органы полового размножения, как правило, одноклеточные. Общим для водорослей является их способность к автотрофному способу питания благодаря наличию фотосинтезирующего аппарата. Вместе с тем у некоторых водорослей наряду с автотрофным питанием существует и гетеротрофное. Наука о водорослях называется альгология.

Известно более 40000 видов водорослей, которые объединяются в 11 отделов: диатомовые – около 20000 видов, зеленые – 13000–20000, красные – около 4000, синезеленые – около 2000, бурые – около 1000, динофитовые и криптофитовые – более 1000, желтозеленые, золотистые, харовые – свыше 300 в каждом отделе, эвгленовые – около 840 видов. Водоросли всех отделов в процессе эволюции развивались в основном независимо друг от друга; от них, вероятно, происходят наземные хлорофиллоносные растения.

**Структура (типы таллома) водорослей (морфологическая дифференциация тела).** Водоросли в пределах слоевищного типа строения отличаются исключительным морфологическим разнообразием. Их тело может быть одноклеточным, колониальным, многоклеточным. Их размеры в пределах каждой из этих форм отличаются огромным диапазоном – от микроскопических (1 мкм) до гигантских (есть виды, достигающие нескольких десятков метров). С учетом большого морфологического разнообразия вегетативного тела водоросли по структуре можно разделить на несколько категорий, образующих главнейшие ступени морфологической эволюции.

**Монадная (жгутиковая) структура** (рис. 35) свойственна одноклеточным и колониальным организмам и характеризуется наличием у них клеток одного, двух или нескольких жгутиков, обуславливающих активное движение в воде. Эта структура преобладает у динофитовых и криптофитовых, золотистых и эвгленовых водорослей. У более высокоорганизованных водорослей монадное строение имеют клетки, служащие для бесполого (зооспоры) или полового (гаметы) размножения.



Рисунок 35 – Монадный таллом *Euglena* sp.

**Амебоидная (ризоподиальная) структура** (рис. 36) характеризуется отсутствием постоянной формы клетки, плотной оболочки и жгутиков. Передвигаются эти водоросли, как и амёбы, с помощью псевдоподий, которые сохранились у динофитовых, золотистых и желтозеленых водорослей.

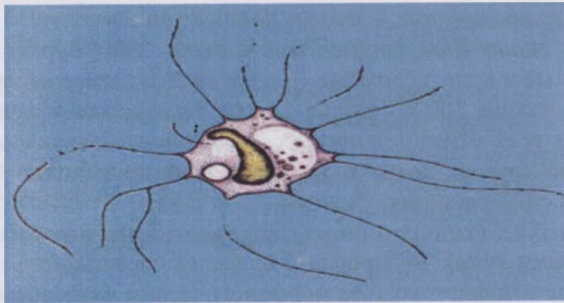


Рисунок 36 – Амебоидный, или ризоподиальный таллом *Chrysamoeba* sp.

**Пальмеллоидная (гемимонадная или капсальная) структура** (рис. 37) представляет собой соединение множества неподвижных клеток, погруженных в общую слизь, но не имеющих плазматических связей. Возникновение такого типа структуры было важным этапом на пути морфологической эволюции водорослей в направлении от подвижных монадных к типично растительным неподвижным формам. Пальмеллоидная структура широко представлена у зеленых, желтозеленых и золотистых водорослей; в других отделах она встречается реже или вообще отсутствует.

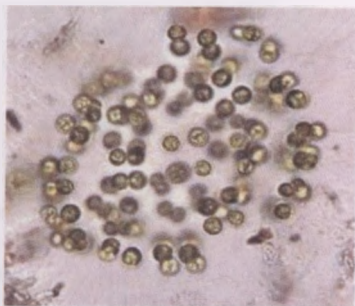


Рисунок 37 – Пальмеллоидный, или капсальный таллом *Apicystis* sp.

**Коккоидная структура** (рис. 38) характеризуется неподвижными клетками различной формы и размеров, с плотной клеточной стенкой, одиночными или соединенными в колонии (ценобии). Такая структура встречается почти во всех отделах (за исключением эвгленовых) водорослей, а у диатомовых она является единственной; у других представителей наблюдается в циклах развития (апланоспоры, акинеты, тетраспоры и др.).

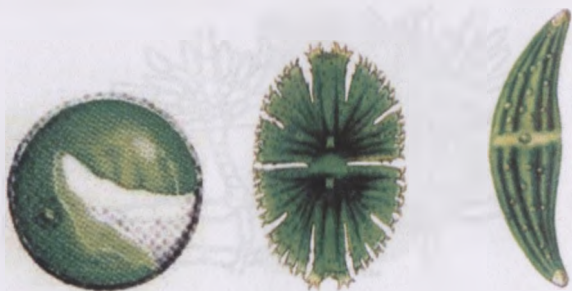


Рисунок 38 – Коккоидный таллом

**Нитчатая (трихальная) структура** (рис. 39) в мире водорослей является простейшей формой многоклеточного слоевища и представляет собой соединение неподвижных клеток в нити, между которыми осуществляется физиологическое взаимодействие с помощью плазмодесм. Нити могут быть простыми и ветвящимися, свободноживущими, прикрепленными и объединенными чаще всего в слизистые колонии. Нитчатая структура представлена среди зеленых, золотистых, желтозеленых, красных водорослей.

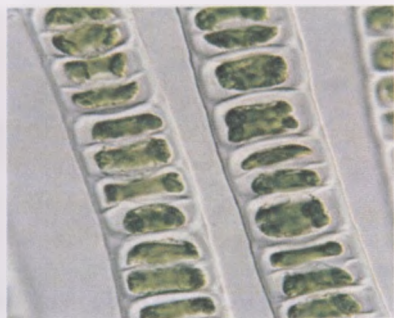


Рисунок 39 – Нитчатый, или трихальный таллом *Ulothrix* sp.

**Разнонитчатая (гетеротрихальная) структура** (рис. 40) является более сложным вариантом нитчатого строения, для которого характерны две системы нитей: стелющиеся по субстрату и отходящие от них вертикально. Гетеротрихальная структура свойственна многим синезеленым, зеленым, харовым, золотистым, желтозеленым, красным и бурым водорослям и может быть постоянной или временной формой.

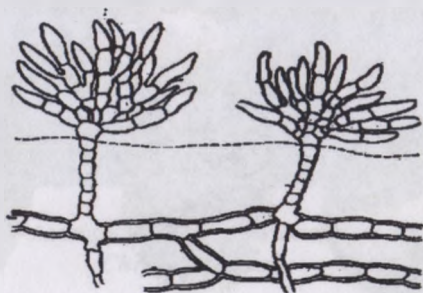
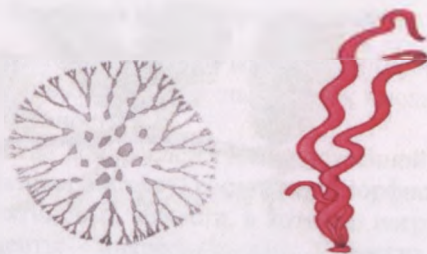


Рисунок 40 – Разнонитчатый, или гетеротрихальный таллом *Fritschiella* sp.

**Псевдопаренхиматозная (ложнотканевая) структура** (рис. 41) характеризуется образованием крупных объемных слоевищ в результате срастания нитей разнонитчатого слоевища, иногда сопровождаемого дифференциацией «тканей». Поскольку последние по способу образования отличаются от настоящих, их называют ложными тканями. Встречается данное явление у некоторых красных водорослей.



**Рисунок 41** – Псевдопаренхиматозный, или ложнотканевой таллом *Nemalion* sp.

**Паренхиматозная (тканевая) структура** (рис. 42) характеризуется многоклеточными слоевищами в форме пластинок, состоящих из одного и более слоев клеток. При делении клеток первичных нитей в разных плоскостях могут возникать паренхиматозные слоевища с тканями, выполняющими ассимиляционную, проводящую, запасающую функции. Тканевая структура представлена у бурых, красных и зеленых водорослей.



**Рисунок 42** – Паренхиматозный, или тканевой таллом *Ulva* sp.

**Сифональная (сифоновая) структура** (рис. 43) – слоевище, часто крупных размеров и сложной морфологической дифференцировки, без клеточных перегородок и обычно с множеством ядер. Сифональный тип организации представлен у некоторых зеленых и желтозеленых водорослей.



Рисунок 43 – Сифональный таллом *Caulerpa* sp.

**Сифонокладальная структура** (рис. 44) встречается у некоторых нитчатых зеленых водорослей, для которых свойственно сегрегационное деление многоядерных клеток: протопласт распадается на окруженные мембраной округлые части, дающие начало новым сегментам таллома.



Рисунок 44 – Сифонокладальный таллом *Valonia* sp.

**Харофитная (членисто-мутовчатая) структура** (рис. 45) свойственна только харовым водорослям. Таллом крупный, многоклеточный, состоит из главного побега с ветвями и отходящими от него, иногда вставляющимися, членистыми боковыми побегами. Боковые побеги отходят от главного в области узлов, часть побега между узлами состоит, как правило, из одной крупной клетки и называется междуузлем.



Рисунок 45 – Харофитный таллом *Chara* sp.

## Строение клетки водорослей

Организация клетки большинства водорослей (кроме синезеленых) мало отличается от организации типичных клеток высших растений, однако имеет и свои особенности.

Клетка большинства водорослей одета постоянной клеточной оболочкой, имеет двухфазную систему, состоит из аморфного матрикса, гemicеллюлозы или пектиновых веществ, в которые погружены волокнистые скелетные элементы – микрофибриллы. У многих водорослей откладываются добавочные компоненты: карбонат кальция (харовые, ацетобулария, падина), альгиновая кислота (бурые), железо (красные). У некоторых видов зеленых, красных и бурых водорослей имеется кутикула в виде наружного слоя, одевающего нити (эдогониум, кладофора).

У диатомей матрикс оболочки, состоящий из пектиновых веществ, содержит в качестве скелетного вещества не целлюлозу, а кремний. Лишь немногие водоросли являются голыми, чаще они покрыты пелликулой – плотным эластичным белковым слоем (эвгленовые) или перипластом – многослойным более плотным покровом с порами (динофитовые) и способны изменять форму своего тела. Оболочки некоторых водорослей образуют теки – многокомпонентные сложные системы под плазмалеммой с трихоцистами и порами (у перидиней), в которых лежит протопласт.

В жизни растительной клетки важную роль играет наличие в оболочке сначала пектиновой, а затем целлюлозной фракций, обеспечивающих опорную и защитную функции, а также способность к проницаемости и росту. Клеточная оболочка бывает цельной или состоит из двух и более частей, пронизана порами, может нести различные выросты. Под оболочкой находится протопласт, включающий цитоплазму и ядро.

Водоросли – единственная группа, где имеются все три типа клеточной организации: прокариотическая (синезеленые водоросли, где ядер нет, их роль выполняет нуклеоид); мезокариотическая (динофитовые, есть ядро, но примитивное) и эукариотическая (водоросли остальных отделов – настоящие ядерные организмы).

Цитоплазма у большинства водорослей расположена тонким пленочным слоем, окружая большую центральную вакуоль с клеточным соком. Вакуоль отсутствует в клетках синезеленых водорослей и монадных (у пресноводных монадных форм отмечены пульсирующие вакуоли). В цитоплазме эукариотных водорослей хорошо различимы элементы эндоплазматической сети, рибосомы, митохондрии, аппарат Гольджи, хроматофоры, клеточные ядра; имеются также лизосомы, пероксисомы, сферосомы. В клетках водорослей (за исключением синезеленых)

из органелл особенно заметны хроматофоры (хлоропласты), которые в отличие от хлоропластов высших растений разнообразны по форме, окраске, числу, строению и местоположению в клетке. Они могут быть чашевидными (хламидомонада), спиральными (спирогира), пластинчатыми (пеннатные диатомеи), цилиндрическими (эдогониум). У многих водорослей хроматофоры многочисленны и имеют вид зерен или дисков, расположенных в постенной цитоплазме (зеленые с сифоновой организацией, бурые, красные). Хроматофоры окружены оболочкой, состоят из стромы, пластинчатых структур, которые напоминают уплощенные мешочки и называются тилакоидами. В них сосредоточены пигменты. Кроме того, в матриксе хроматофора находятся рибосомы, ДНК, РНК, липидные гранулы и особые включения – пиреноиды. Пиреноид является специфическим образованием, присущим всем водорослям (за исключением синезеленых) и небольшой группе мхов. Установлено, что пиреноиды – не только место скопления запасных веществ, но и зона, в которой или при участии которой наиболее активно осуществляется их синтез. Пиреноид остановился на полпути в своем развитии и не достиг структурного воплощения органеллы. Об этом свидетельствует отсутствие пиреноидов в клетках высших растений. Однако в деталях тонкого строения, касающихся оболочки, расположения тилакоидов и фибрилл ДНК, формы пиреноидов, места образования и отложения зерен запасных полисахаридов, хроматофоры водорослей обнаруживают достаточно четкие различия, что и позволяет использовать их наряду с набором пигментов, продуктами запаса и строением жгутикового аппарата в качестве таксономических признаков больших групп – отделов водорослей.

Так, у зеленых, харовых и красных водорослей оболочка хроматофора образована только двумя параллельными мембранами, у динофитовых и эвгленовых – тремя. Золотистые, желто-зеленые, диатомовые и бурые водоросли, одетые четырехмембранной оболочкой, имеют сложную систему мембран, находящуюся в прямой зависимости от мембраны ядра. Расположение тилакоидов в матриксе хроматофора неодинаково в разных отделах водорослей, при этом их хроматофоры со сходными пигментами характеризуются и сходным расположением тилакоидов. Наиболее простое их расположение наблюдается у красных водорослей, у которых тилакоиды лежат в матриксе поодиночке.

У остальных эукариотных водорослей тилакоиды группируются, образуя ламеллы, причем число тилакоидов, входящих в состав одной ламеллы, в пределах больших групп, объединяющих родственные водоросли, постоянно.

Есть водоросли (криптофитовые), у которых тилакоиды соединяются по два. У золотистых, желтозеленых, диатомовых, бурых, динофитовых и эвгленовых водорослей они располагаются преимущественно по три. У зеленых, харовых и эвгленовых число тилакоидов может достигать 20; в таких случаях стопки тилакоидов столь тесно прижаты друг к другу, что пространство между соседними тилакоидами исчезает, и тогда эти стопки называют гранами.

В матриксе хроматофора между ламеллами и вокруг пиреноида у зеленых и харовых водорослей откладывается крахмал, а у всех остальных – хризоламинарин, ламинарин, крахмал динофитовых и криптофитовых водорослей, парамилон и багрянковый крахмал вне хроматофора, в цитоплазме.

У монадных форм имеется красный глазок, или стигма, состоящая из пигментонесущих глобул, расположенных плотными рядами, и жгутики, с помощью которых водоросли передвигаются. Жгутики имеют сложное строение, прикрепляются к особому базальному телу. У некоторых неподвижных форм около ядра отмечены центриоли, по форме и структуре схожие с базальными телами. В процессе эволюции водорослей жгутиковый аппарат постоянно редуцировался, водоросли становились неподвижными, центриоли в клетках исчезали. Шел интенсивный формообразовательный процесс, создавался такой тип клеточной организации, который позволил растениям перейти к наземному образу жизни.

### Размножение водорослей

**Бесполое размножение** у одноклеточных водорослей осуществляется путем деления клетки, у колониальных и нитчатых – в результате распада колоний или нитей на отдельные фрагменты; у немногих водорослей образуются специальные органы размножения, например клубеньки у харовых, акинеты (особые клетки с большим количеством запасных веществ и пигментов) – у зеленых и др. Такое размножение часто называют *вегетативным*.

Бесполое размножение происходит также посредством неподвижных спор (апланоспор) или зооспор (спор со жгутиками), образующихся путем деления протопласта обычных или особых клеток, называемых спорангиями.

У ряда представителей зеленых водорослей апланоспоры уже в материнской клетке иногда приобретают все отличительные черты этой клетки. В таких случаях говорят об автоспорах. Размножение при помощи спор называется *собственно бесполом размножением*.

**Половое размножение** характеризуется наличием полового процесса, одним из важнейших этапов которого является оплодотворение, т.е. слияние гаплоидных половых клеток – гамет. В результате оплодотворения образуется зигота с новой комбинацией наследственных признаков, которая и становится родоначальницей нового организма.

У водорослей различают следующие формы полового процесса: *хологамию* – слияние двух одноклеточных особей; *изогамию* – слияние одинаковых по строению и величине подвижных гамет; *гетерогамию* – слияние подвижных гамет разных размеров (более крупную считают женской); *оогамию* – слияние крупной неподвижной яйцеклетки с мелкой подвижной мужской гаметой – сперматозоидом или неподвижным, лишенным оболочки спермацием (у красных водорослей); *конъюгацию* – слияние протопластов неспециализированных клеток. Гаметы образуются в клетках, не отличающихся от вегетативных, или в особых клетках, получивших название – гаметангии. Гаметангии, содержащие яйцеклетку (редко несколько), называются *оогониями*, а те, в которых формируются сперматозоиды или спермации, – *антеридиями*. У примитивных водорослей каждая особь способна формировать и споры, и гаметы в зависимости от времени года и внешних условий; у других функции бесполого и полового размножения выполняют разные особи – спорофиты (образуют споры) и гаметофиты (образуют гаметы). В жизненном цикле ряда водорослей происходит строгое чередование поколений – гаметофита и спорофита.

**Основные типы жизненных циклов водорослей.** Циклы развития водорослей весьма многообразны, отличаются большой пластичностью и предопределяются многими экологическими факторами.

1. *Гаплофазный тип* характеризуется отсутствием чередования поколений. Вся вегетативная жизнь водорослей проходит в гаплоидном состоянии, т.е. они являются гаплонтами. Диплоидна лишь зигота, прорастание которой сопровождается редукционным делением ядра (зиготическая редукция). Развивающиеся при этом растения оказываются гаплоидными. Примером являются многие зеленые (вольвовковые, большинство хлорококковых, конъюгаты) и харовые водоросли.

2. *Диплофазный тип* отличается тем, что вся вегетативная жизнь водорослей осуществляется в диплоидном состоянии, а гаплоидная фаза представлена только гаметами. Перед их образованием происходит редукционное деление ядра (гаметическая редукция). Зигота без деления ядра прорастает в диплоидный таллом. Эти водоросли являются диплонтами. Такой тип развития характерен для многих зеленых водорослей, имеющих сифоновую структуру, всех диатомовых и некоторых представителей бурых (порядок Фукальные).

3. *Диплогаметофитный тип* характеризуется тем, что в клетках диплоидных талломов (спорофитов) многих водорослей редукционное деление ядра предшествует образованию зоо- или апланоспор (спорическая редукция).

Споры развиваются в гаплоидные растения (гаметофиты), размножающиеся только половым путем. Оплодотворенная яйцеклетка – зигота – прорастает в диплоидное растение, несущее органы бесполого размножения. Таким образом, у этих водорослей имеет место чередование форм развития (генераций): диплоидного бесполого спорофита и гаплоидного полового гаметофита. Оба поколения по внешнему виду могут не различаться и занимать одинаковое место в цикле развития (изоморфная смена генераций) или же резко различаться по морфологическим признакам (гетероморфная смена генераций). Изоморфная смена генераций характерна для ряда зеленых (ульва, энтероморфа, кладофора), бурых и большинства красных водорослей.

Гетероморфная смена генераций встречается с преобладанием как гаметофита, так и спорофита (свойственна преимущественно бурым, реже зеленым и красным водорослям). Подробнее жизненные циклы будут рассматриваться при описании соответствующих групп водорослей.

### Экологические группировки водорослей

Способность водорослей адаптироваться к разнообразным внешним условиям, неприхотливость и высокая физиологическая пластичность способствовали расселению их по всему земному шару. Водоросли встречаются в реках и морях, на поверхности почвы и в ее толще, на деревьях, различных постройках, скалах, в снегу и горячих источниках.

Основной средой жизни для водорослей служит вода. Кроме того, исключительно важную роль в их жизнедеятельности играют такие факторы, как свет, температура, соленость воды, химический состав субстрата и др. В зависимости от экологических условий водоросли образуют различные группировки или сообщества (ценозы), каждое из которых характеризуется более или менее определенным видовым составом.

Различают следующие экологические группировки водорослей: планктонные (фитопланктон), нейстонные (фитонейстон), бентосные (фитобентос), аэрофильные (аэрофитон), почвенные (фитоэдафон), водоросли горячих источников (термофитон), снега и льда (криофитон), соленых вод (галофитон), известкового субстрата (кальцефилы) и др.

Представители первых трех ценозов – типичные обитатели водной среды. Аэрофильные и почвенные водоросли приспособились к существованию в наземных условиях. Далее следуют группировки водорос-

лей, постоянно находящиеся в крайних условиях существования, связанных с воздействием экстремальных температур (термальные и криофильные водоросли) либо необычного по составу субстрата (галофитон и кальцефили).

**Планктоном** называют совокупность преимущественно микроскопических, свободно плавающих в толще воды растительных (фитопланктон) и животных (зоопланктон) организмов. Для облегчения переноса водой организмы планктона (бактерии, водные грибы, водоросли, беспозвоночные животные) имеют различные приспособления, которые уменьшают удельную массу тела (газовые вакуоли, включения жиров и липоидов, насыщенность водой и студенистость тканей) и увеличивают его удельную поверхность (разветвленные выросты, приплюснутая форма тела и др.).

**Нейстон** – совокупность мелких организмов, обитающих у поверхностной пленки воды (сверху – эпинейстон, снизу – гипонейстон). Это сообщество организмов чаще встречается в мелких, защищенных от ветра водоемах (лужи, торфяные карьеры, канавы, пруды). В пресноводном нейстоне наиболее распространены золотистые (виды рода хромулина), эвгленовые (виды родов эвглена, трахеломонас), зеленые (виды рода хламидомонада) и другие водоросли.

У многих нейстонных организмов для удержания в зоне поверхностной пленки имеются специальные приспособления в виде слизистых колпачков наподобие маленьких парашютов, плавательных пластинок и т. д.

**К фитобентосу** принадлежат все водоросли, живущие на дне водоемов или обрастающие различные водные предметы, а также плавающие на поверхности воды зеленые ватообразные скопления, называемые тиной. В составе пресноводных бентосных водорослей представлены все отделы, кроме бурых, – харовые (хара, нителла, нителлопсис), зеленые (кладофора, эдогониум, улотрикс, спиругири, мужоция, хетофора, драпарнальдия), синезеленые (осциллятория, носток), диатомовые (навикула, пиннулярия), десмидиевые (космариум, кластериум и др.).

Водоросли, прикрепившиеся к стеблям и листьям высших водных растений и другой поверхности, возвышающейся над дном водоема, относят к перифитону.

**Наземные, или аэрофильные,** водоросли образуют различно окрашенные налеты и пленки на деревьях, скалах, сырой земле, крышах и стенах домов, на заборах и т. д. Особенно много наземных водорослей в районах с теплым и влажным климатом.

Для перенесения аэрофитами неблагоприятных условий жизни на суше (резкая смена температуры днем и ночью, летом и зимой, кратко-

временное увлажнение и т. д.) строение их клеток отличается рядом особенностей: они имеют слоистые, сильно утолщенные стенки, слизистые обертки, чехлы, удерживающие воду, накапливающиеся в больших количествах масла и более вязкую цитоплазму.

Общее количество наземных водорослей составляет несколько сотен видов, принадлежащих в основном к трем отделам: синезеленым, зеленым и диатомовым.

На коре деревьев, например, растут обычно зеленые водоросли (плеврококк, трентеполия, хлорококк, хлорелла и др.), а на поверхности постоянно увлажненных каменных глыб или стен наряду с некоторыми зелеными (космариум, цилиндростис) и диатомовыми (пиннулярия) изобилуют и синезеленые (в частности, глеокапса, стигонема, носток и др.).

*Почвенные водоросли* обитают на поверхности почвы или в ее самых верхних горизонтах. Некоторые представители проникают на глубину 1–2 м и более. Высказывается предположение, что глубоко в почве они переходят на сапротрофное питание. При полном же исключении видимой части спектра для фотосинтеза они способны использовать невидимую лучистую энергию.

### **Особенности строения и жизнедеятельности водорослей**

Для растений, обитающих в океанах, морях и пресноводных водоемах, вода не только необходимый экологический фактор, но и среда обитания, для которой характерны: ослабление освещенности и изменение спектрального состава света с глубиной и, соответственно, снижение доли фотосинтетически активной радиации (ФАР), а также продолжительности светового дня; меньшее количество воздуха, растворенного в воде, иной его состав (содержание кислорода, например, в воде на единицу объема в 30–35 раз меньше, чем в воздухе) и большая, чем в атмосфере, его изменчивость, возможность накапливания в воде  $\text{CO}_2$  (0,2–0,5 мл/л),  $\text{N}_2$ , а в анаэробных условиях –  $\text{NH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ; отсутствие резких перепадов температуры в течение года и суток; широкий диапазон солености – от тысячных долей грамма до 350 г/л и больше (основными элементами минерального питания водорослей являются азот, фосфор, кремний, железо, марганец); движение воды (гидродинамический фактор), особенно в прибрежной (приливо-отливной) зоне, где водоросли подвергаются воздействию таких мощных факторов, как прибой и удары волн, отливы и приливы и др.

Чтобы обеспечить свое существование в жестких условиях водной среды обитания, водоросли обладают рядом морфологических и физиологических особенностей:

1. Клетки многих водорослей имеют оболочку, внутренний слой которой целлюлозный, а наружный — пектиновый. Оболочка удачно сочетает защитную и опорную функции с возможностью ростовых процессов и проницаемостью. Оболочки значительно утолщаются при дефиците влаги, иногда интенсивно пропитываются (инкрустируются) карбонатом кальция (у харовых), покрываются органическими соединениями (например, кутином, секретируемыми протопластом клетки. Кутин, помимо опорной, выполняет и защитную функцию, поскольку задерживает губительные ультрафиолетовые Лучи и предохраняет клетки от излишней потери воды в период отлива. Пектиновый слой защищает клетку от вредного влияния различных кислот и других столь же сильных реагентов.

2. Слоевиде морских бентосных водорослей прочно прикреплено к грунту *ризоидами* или *базальным диском*, поэтому водоросли сравнительно редко отрываются от субстрата в случаях прибоев и ударов волн.

3. Таллом водоросли, как правило, не сплошной, а рассеченный. Он дихотомически ветвится в одной плоскости, что позволяет свести к минимуму сопротивление толщине воды. К тому же он прочный и упругий.

4. У некоторых водорослей имеются специальные воздушные пузыри, которые удерживают слоевище у поверхности воды, где есть возможность максимального улавливания света для фотосинтеза.

5. Водорослям приходится адаптироваться не только к недостатку света на разных глубинах водоема, но и к изменению его спектрального состава путем генетически обусловленной выработки дополнительных фотосинтезирующих пигментов. В мелководных зонах, где растениям еще доступны красные лучи, в наибольшей степени поглощаемые хлорофиллом, преобладают зеленые водоросли. В более глубоких зонах, куда проникает синий свет, встречаются бурые водоросли, содержащие кроме хлорофилла бурый пигмент фукоксантин. Еще глубже (до 268 м) обитают красные водоросли, имеющие пигментные группы фикобилинов — фикозитрин, фикоцианин и аллофикоцианин, хорошо приспособленные к поглощению зеленых, фиолетовых и синих лучей.

6. Глубоководные виды водорослей имеют более крупные хроматофоры с высоким содержанием пигментов, низкую точку компенсации фотосинтеза (30–100 люкс), теневой характер световой кривой фотосинтеза с низким плато насыщения.

7. Таллом многих водорослей выделяет много *слизи*, которая заполняет их внутренние полости и выделяется наружу. Слизь помогает лучше удерживать воду и препятствует обезвоживанию.

8. Осмотическое давление в клетках водоросли намного выше, чем в морской воде, поэтому осмотических потерь воды не наблюдается.

9. Выход спор и гамет у морских водорослей совпадает с приливом. В этот период из репродуктивных органов освобождаются споры, мужские и женские гаметы, которые, как правило, обладают таксисами, определяющими направления их движения в зависимости от света, температуры, химических веществ, содержащихся в воде, и др. У спор, лишенных жгутиков, наблюдается амебOIDное движение. Развитие зиготы происходит сразу же после оплодотворения, чтобы не оказаться унесенной в океан.

### Значение водорослей в природе и жизни человека

Водоросли играют существенную роль в жизни биосферы и хозяйственной деятельности человека. Благодаря способности к фотосинтезу, они являются основными продуцентами громадного количества органических веществ в водоемах, которые широко используются животными и человеком.

Поглощая из воды углекислый газ, водоросли насыщают ее кислородом, необходимым для всех живых организмов. Велика их роль и в биологическом круговороте веществ, в циклическом характере которого решена проблема длительного существования и развития жизни на Земле.

В историческом и геологическом прошлом водоросли принимали участие в образовании горных и меловых пород, известняков, рифов, особых разновидностей угля, ряда горючих сланцев и явились родоначальниками растений, заселивших сушу.

Поскольку в морских водорослях установлено наличие витаминов *A, B1, B2, B12, C и D*, иода, брома, мышьяка и др., они чрезвычайно широко используются в различных отраслях хозяйственной деятельности человека, в том числе в пищевой, фармацевтической и парфюмерной промышленности. Их возделывают в установках под открытым небом с целью получения биомассы как дополнительного источника белка, витаминов и биостимуляторов роста и развития в животноводстве и птицеводстве.

Многие водоросли используются в пищу человека. В частности, на Сандвичевых островах из 115 имеющихся видов местное население в пищу употребляет около 60. Наибольшей известностью как лечебное и профилактическое средство пользуется морская капуста (некоторые виды ламинарии), применяемая против желудочно-кишечных расстройств, склероза, зоба, рахита и ряда других заболеваний.

В сельском хозяйстве водоросли применяют как органические удобрения под некоторые культуры, а также в качестве кормовой добавки в пищевом рационе домашних животных.

Способность хлореллы ассимилировать до 10–18 % световой энергии (против 1–2 % у остальных растений) позволяет использовать эти микроводоросли для регенерации воздуха в замкнутых биологических системах жизнеобеспечения человека при длительных космических полетах и подводном плавании.

Некоторые водоросли (например, хлорелла) способны накапливать радионуклиды, что может быть использовано для дополнительной очистки слабоактивных сточных вод атомных электростанций.

Вместе с тем сильное размножение водорослей может наносить значительный ущерб хозяйственной деятельности человека. Наряду с другими организмами они участвуют в обрастании морских судов, ухудшая тем самым их эксплуатационные качества. Некоторые водоросли, особенно синезеленые, вызывают «цветение» воды, придавая неприятный вкус и запах.

### Использование водорослей в биотехнологии

В 70–80-е годы XX века в СССР биотехнологией микроводорослей занималось множество лабораторий в России, Молдавии, Казахстане, Узбекистане, Эстонии, на Украине. В то же самое время эти исследования активно развивались в США, Израиле, Австралии, Германии (ГДР), Испании, Италии, Японии. Все эти работы в конечном счете вылились в разработку систем жизнеобеспечения для космических полетов, технологий получения биотоплива третьего поколения, медицинских и профилактических препаратов, а также пищевых добавок и косметических средств.

Сегодня биотехнологии микроводорослей развиваются не очень интенсивно. Например, в России работы в этом направлении ведутся в МГУ, Институте физиологии растений РАН. В этом же направлении работают 3–5 частных компаний (из Пензенской, Вологодской, Новосибирской областей). Эти фирмы занимаются разработкой систем культивирования микроводорослей, в основном хлореллы, для нужд птицеводства и животноводства. Компании же, работающие в области производства биодобавок или косметических средств, в основном пользуются дешевым зарубежным сырьем, которое завозится из теплых стран.

Водоросли служат сырьем для получения ценных органических веществ: спиртов, лаков, аммиака, органических кислот, альгина.

Одним из самых ценных продуктов, получаемых из красных водорослей, является *агар* – полисахарид, присутствующий в их оболочках и состоящий из агарозы и агаропектина. Количество его доходит до 30–40 % от веса водорослей (водоросли *анфельция*, *лауренция*, *грацилярия*, *гелидиум*).

Агар-агар широко применяется в лабораторных биологических работах как твердая среда, на которой с добавлением определенных питательных веществ культивируют грибы, водоросли и бактерии, культуры клеток и тканей растений. В больших количествах его используют в пищевой промышленности при изготовлении мармелада, пастилы, мороженого и других изделий.

Особое место занимает использование биомассы спирулины в качестве источника микроэлементов (йод, селен и пр.) крайне необходимых для полноценной жизнедеятельности человека. Биомасса спирулины, как готовый продукт к употреблению, используется в различных сферах человеческой деятельности: медицине, косметологии, спорте, животноводстве, пчеловодстве, рыбоводстве, птицеводстве, ветеринарии и пр. Не менее важными является получение из биомассы микроводорослей аминокислот, протеинов, разнообразных углеводов, липидов, пигментов, витаминов и т. д. У спирулины на первое место выступают природные красители (пигменты) фикобилипротеины (фикоцианины). Содержание таких пигментов у спирулины достаточно высоко (около 10 %), что всегда делает возможным использование биомассы как сырья для получения пигментов.

В основном водоросли используются для получения белка. Весьма перспективны в этом отношении культуры одноклеточных водорослей, в частности высокопродуктивных штаммов рода *Chlorella u Scenedesmus*. Их биомасса после соответствующей обработки используется в качестве пищевых и витаминных добавок к кормам для коров и птицы (*Ulva spp.*, *Porfira spp.*, *Undaria spp.*, *Rhodimonia spp.*, *Alaria spp.*). К примеру, за теплый период года (6–8 месяцев) можно получить 50–60 т биомассы хлореллы с 1 га, тогда как одна из самых высокопродуктивных трав – люцерна дает с той же площади только 15–20 т урожая. Хлорелла содержит около 50 % белка, а люцерна – лишь 18 %.

В целом, в пересчете на 1 га, хлорелла образует 20–30 т чистого белка, а люцерна – 2–3,5 т. Кроме того, хлорелла содержит 40 % углеводов, 7–10 % жиров, витамины А (в 20 раз больше), В<sub>2</sub>, К, РР и многие микроэлементы. Варьируя состав питательной среды, можно сдвинуть процессы биосинтеза в клетках хлореллы в сторону накопления либо белков, либо углеводов, а также активировать образование тех или иных витаминов, для дальнейшего их использования в качестве пищевых и витаминных добавок к кормам для коров и птицы (*Ulva spp.*, *Porfira spp.*, *Undaria spp.*, *Rhodimonia spp.*, *Alaria spp.*).

Среди биотехнологических штаммов водорослей, широко используемых во всем мире для получения ценных медицинских препаратов, пи-

шевых и кормовых добавок, наибольший интерес представляют 3 рода – *Dunaliella*, *Chlorella* и *Scenedesmus*.

*Dunaliella* – одноклеточная зеленая водоросль – объект массового промышленного культивирования для получения витаминов, липидов, спиртов (в частности, этанола) и антибиотиков. Особенно интенсивно эта водоросль используется для получения в промышленных масштабах глицерола, каротина и полиненасыщенных жирных кислот, являющихся предшественниками простагландина и препятствующих развитию атеросклероза и других заболеваний.

*Chlorella* (*C. vulgaris*, *C. ellipsoidea*, *C. pyrenoidosa* и др.) – одноклеточная зеленая водоросль – активный продуцент белков, углеводов, липидов, витаминов с легко регулируемым соотношением этих соединений при изменении условий культивирования. По качеству продуцируемого белка хлорелла превосходит все известные кормовые и пищевые продукты: в нем имеются все необходимые аминокислоты, в том числе незаменимые. В клетках хлореллы присутствуют каротин, витамины В1, В2, В3, В6, В12, С, D, К, РР, Е, пантотеновая кислота, фолиевая кислота, биотин. По содержанию витаминов хлорелла превосходит дрожжи. Хлорелла рекомендуется как терапевтическое и общеукрепляющее средство, повышающее иммунный статус организма.

Гидролизаты белка зеленой водоросли *Scenedesmus* используются в медицине и косметической промышленности. Их биомасса после соответствующей обработки используется в качестве добавки в рационы скота, а также в пищевых целях.

Широко культивируются ламинария и порфира дальневосточных или северных морей. Ламинария наряду с хлореллой является самой популярной съедобной и кормовой водорослью.

Известны и другие съедобные макрофитные водоросли – ульва, алария, родимения, хондрус, ундария и др.

Бурые водоросли являются единственным источником получения одних из самых ценных веществ водорослей – солей альгиновой кислоты – **альгинатов**, широко используемых в различных областях народно-го хозяйства.

Бурые водоросли богаты также весьма полезным соединением – шестиатомным спиртом **маннитом**, который с успехом применяют в пищевой промышленности, фармацевтике, при производстве бумаги, красок, взрывчатых веществ и др. Еще одно перспективное направление – получение из бурых водорослей биогаза.

В последние годы культивируются водоросли на коммунально-бытовых и промышленных сточных водах с целью их биологической очистки и дальнейшего использования биомассы водорослей для полу-

чения метана или применения в промышленности и сельскохозяйственном производстве. Некоторые водоросли (например, хлорелла) способны накапливать радионуклиды, что может быть использовано для дополнительной очистки слабоактивных сточных вод атомных электростанций.

### Технология получения белковой массы из клеток водорослей

Технология получения белковой массы из клеток водорослей включает выращивание промышленной культуры в культиваторах открытого или закрытого типа, отделение водорослей от массы воды, приготовление товарного продукта в виде суспензии, сухого порошка или пастообразной массы. Процесс отделения клеток водорослей от массы воды энергоемкий, так как необходимо перерабатывать большие объемы жидкости.

Вначале отстаивают клеточную суспензию, затем клетки водорослей отделяют от воды декантацией. Для ускорения осаждения клеток часто применяют метод химической флокуляции, вызывающий быструю коагуляцию частиц. После осаждения клеточной биомассы ее пропускают через сепаратор, в результате чего происходит концентрирование суспензии до необходимой концентрации. Если требуется получить пастообразный препарат, то полученную белковую массу высушивают. Для улучшения переваримости биомассы клеток хлореллы и сценедесму проводят их обработку с целью разрушения клеточных оболочек.

Микроводоросли выращиваются либо открытым способом – в водоемах или бассейнах под солнцем, либо в закрытых фотобиореакторах с использованием искусственного освещения (рис. 46).



а



б

**Рисунок 46** – Культивирование водорослей:

а – в естественных условиях, б – в искусственных условиях

И в том и в другом случае имеются свои плюсы и минусы. Если микроводоросли нужны для получения биомассы, которая будет исполь-

зована как корм для животных, либо для дальнейшей переработки в сырьевые материалы: биотопливо, бионефть и т. п., то предпочтительным выглядит малозатратный способ культивирования с использованием больших площадей открытых водоемов и бесплатного солнечного света. При этом надо иметь в виду, что не долетевшие до цели насекомые, а также экскременты птиц и т. п. могут оказаться в бюджетной биомассе. Поэтому, если целью является получение определенных веществ для нужд медицины, производство которых требует технологических ограничений в виде заданных режимов культивирования (температура, свет, состав и свойства среды, концентрация углекислого газа и т. д.), то необходимо выращивать микроводоросли в асептических биореакторах с искусственным освещением и в контролируемых условиях. Это выйдет дороже, затратится больше энергии и ресурсов. Но в итоге будете иметь конечный продукт, полученный в контролируемых условиях.

### **Биотопливо из водорослей**

Водоросли – это сырье будущего. Более 40 000 различных типов водорослей могут использоваться в качестве природного ресурса и перерабатываться в биомассу и биотопливо (рис. 47); таким образом, они представляют неистощимое и постоянное средство для производства энергии. Поскольку микроводоросли богаты сахаром, крахмалом, маслами и омега-3 ненасыщенными жирными кислотами, то из них можно произвести в пять-десять раз больше биомассы, чем, к примеру, из кукурузы или канолы (рапса).

#### *Преимущества получения биотоплива из водорослей*

Во время роста водорослей происходит процесс поглощения углекислого газа из окружающей среды, что приводит к снижению уровня атмосферного углекислого газа, вызывает сокращение глобального потепления.

Одним из главных преимуществ водорослей является то, что они имеют гораздо более высокую добычу за акр земли (15–20 раз), чем любой другой конкурирующий вид биотоплива производящийся из растений, таких как кукуруза и подсолнечник. Самым большим преимуществом водорослей для производства биодизельного топлива по сравнению с другими растениями является то, что это растение не используется для пищевых целей. Это дает выгоду в отношении более низкой цены. Водоросли не являются сельскохозяйственной культурой, поэтому могут быть выращены в несельскохозяйственных землях. Лучший тип водорослей для производства биотоплива из различных видов тот, который находится на поверхности прудов и небольших водоемов.

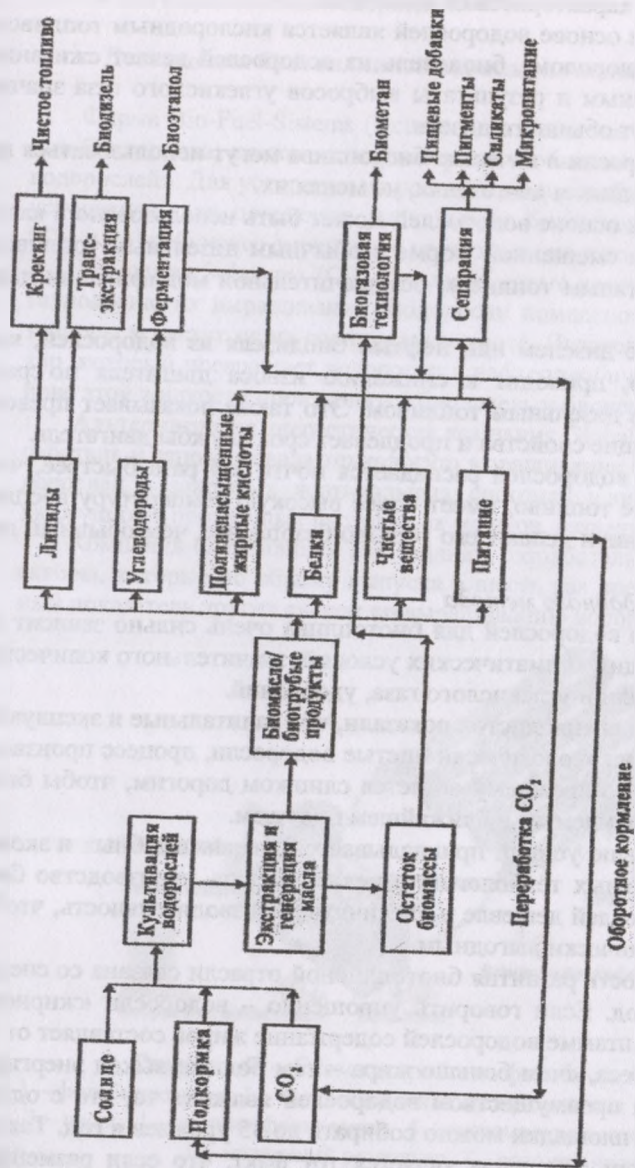


Рисунок 47 – Технологическая схема переработки биомассы водорослей в биотопливо

Биодизель из водорослей можно использовать в дизельных двигателях и в системе вливания топлива с любым негативным влиянием на эксплуатационные характеристики двигателя.

Биотопливо на основе водорослей является кислородным топливом (обогащенным кислородом), биодизель из водорослей делает сжигание топлива более полным и результаты выбросов углекислого газа значительно ниже, чем от обычного дизеля.

Морские водоросли в качестве биотоплива могут использоваться на всех воздушных судах и двигателях, не меняя их.

Биотопливо на основе водорослей может быть использовано в качестве замены или в смешанной форме с обычным дизельным топливом или с любым нефтяным топливом без значительной модификации двигателя.

Смешивание с дизелем или нефтью биодизеля из водорослей, как было установлено, приводит к снижению износа двигателя по сравнению с обычным дизельным топливом. Это также показывает превосходные смазывающие свойства и продлевает срок службы двигателя.

Биодизель из водорослей распадается почти в 4 раза быстрее, чем обычное дизельное топливо, имеет более высокую температуру воспламенения, т.е. вспышки делают его гораздо безопаснее, чем обычный дизель.

#### *Недостатки данного метода*

Производство водорослей для биотоплива очень сильно зависит от наличия подходящих климатических условий, значительного количества воды, плоской земли и углекислого газа, удобрений.

Исследования специалистов показали, что капитальные и эксплуатационные затраты на экологически чистые водоросли, процесс производства биотоплива, по-прежнему остается слишком дорогим, чтобы быть экономически приемлемым в ближайшем будущем.

Намного больше усилий прилагается для масштабных и экономически эффективных технологий, с целью сделать производство биотоплива из водорослей дешевле и увеличить производительность, чтобы сделать ее экономически выгодным.

Перспективность развития биотопливной отрасли связана со спецификой состава вод. Если говорить упрощенно – водоросли «жирнее», так, например, в штамме водорослей содержание жиров составляет от 75 до 85 % сухого веса, «чем больше жира – тем больше выход энергии». Дополнительным преимуществом водорослей является то, что с одной технологической площадки можно собирать до 35 урожаев в год. Также, весьма интересным моментом является тот факт, что если размещать площадки для культивирования «биотопливных водорослей» ниже сбро-

са тепла ТЭЦ, можно «покрыть» до 77 % потребностей в тепле, необходимым для выращивания водорослей.

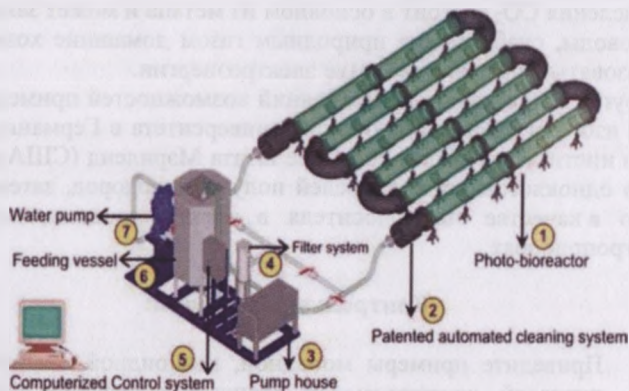
### Достижения биотопливной отрасли на основе водорослей

Фирма Bio-Fuel-Systems (Испания) разработала технологию получения биотоплива, схожего с параметрами с обычной нефтью, из «суперводорослей». Для ускорения их роста был создан «биоэлектромагнитный» ускоритель, для получения уникального биотоплива не содержащего  $\text{SO}_2$ , и не требующее смешения с другими видами топлива.

Компания Solazyme (США) вывела новые водоросли и разработала технологию их выращивания. Водоросли помещаются в стальные контейнеры и растут не на солнце, а в темноте. Питательный элемент – сахар, который превращает водоросли в нефтеподобную жидкость. На основе этой жидкости производится биодизель и биокеросин.

Альтернативная энергетическая компания Global Green Solution разработала и запатентовала технологию выращивания биомассы микроводорослей в закрытых вертикальных системах в виде длинных рядов движущихся прозрачных пастиковых мешков, названная Vertig.

Компания «Альгалинк» Нидерланды разработала новые фотобиореакторы, которые по объему выпуска в шесть раз превышают аналогичный показатель других систем по выращиванию водорослей (рис. 48).



**Рисунок 48** – Схема устройства фотобиореактора:

- 1 – фотобиореактор, 2 – запатентованная автоматическая система очистки,
- 3 – насос, 4 – система фильтрации, 5 – система компьютерного контроля,
- 6 – питающий резервуар, 7 – водяной насос

Фотобиореакторы рассчитаны на массовое производство биодизельного топлива из водорослей и других, ценных биопродуктов из водорослевого масла, созданных с применением запатентованных технологий. Водоросли находятся внутри систем фотобиореакторов непрерывного действия новой конструкции всего 3,5 часа, после чего их собирают и подвергают обработке.

В Японии фирмы Tokyo Gas и NEDO (New Energy and Industrial Technology Development Organization) создали систему брожения биомассы («каши» из морских водорослей) с применением микроорганизмов, в результате которого выделяется метан. Топливо направляется в газовый двигатель, вращающий электрический генератор. На опытной станции Tokyo Gas такая установка переваривает 1 тонну водорослей в день, создавая 20 тысяч литров метана. Для повышения мощности генератора к этому газу, полученному от водорослей, примешивают природный газ. Генератор установки выдает мощность в 10 киловатт – достаточной для питания 20 домов.

В Германии изучением водорослей для использования в качестве биотоплива и борьбы с двуокисью углерода занимается НИИ Rehbrückener Institut für Getreideverarbeitung и баварская фирма Schmack Biogas AG. Им удалось разработать замкнутый цикл превращения  $\text{CO}_2$ , выделяемого из биомассы (там содержится до 40 % двуокиси углерода), с помощью фотосинтеза в биомассу водорослей, которая затем снова используется для производства биогаза. В свою очередь, этот биогаз после отделения  $\text{CO}_2$  состоит в основном из метана и может закачиваться в газопроводы, снабжающие природным газом домашние хозяйства, или использоваться при производстве электроэнергии.

Другое направление исследований возможностей применения водорослей избрали ученые Бохумского университета в Германии и их коллеги из института Venter в Роквилле штата Мэриленд (США). Они с помощью одноклеточных водорослей получают водород, затем используют его в качестве энергоносителя в электростанциях, автомашинах и электроприборах.

### Контрольные вопросы:

- 1 Приведите примеры монадной, коккоидной, нитчатой, разноритчатой, ложнотканевой, тканевой и сифональной организации таллома.
- 2 На какие отделы делятся водоросли и на основании каких признаков?
- 3 Как можно объяснить параллелизм в развитии разных групп водорослей?

- 4 Каковы особенности бесполого (зоо-, аплано- и автоспоры) и полового (изо, гетеро-, оогамия, хологамия и конъюгация) размножения?
- 5 Охарактеризуйте основные типы жизненных циклов развития водорослей.
- 6 Что такое фитопланктон, нейстон, фитобентос, перифитон? Каковы условия жизни водорослей этих групп и их систематический состав?
- 7 Каково значение водорослей в природе и для биотехнологии?

## ТЕМА 7. ПРОСТЕЙШИЕ КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

### Общая характеристика простейших

Название типа *Protozoa* впервые было введено в науку Г. Гольдфусом в 1820 г. Однако наряду с простейшими в современном понимании к *Protozoa* он относил колероваток, мшанок, гидроидных полипов. Ф. Зибольд в 1845 г. впервые дал определение *Protozoa* как животных, «самые разные системы органов которых разделены нечетко, а неправильная форма и простая организация которых могут быть сведены к одной клетке». Сегодня мы знаем, что у существ с одноклеточной организацией могут выполняться почти все те же функции, для которых *Metazoa* необходимы многочисленные клетки в различных дифференцированных тканях и органах.

Таким образом, тип *Protozoa* был четко отграничен от других типов микроскопических животных.

Из 65 тысяч видов *Protozoa* в мире 55 тысяч являются свободно живущими в природе, а 10 тысяч ведут паразитический образ жизни. Среди выделяемых ныне 9 типов простейших организмов жгутиковым отводят место пограничных существ, являющихся ближайшими предками многоклеточных животных и растений и образующих связующее звено между ними.

Простейшие широко распространены в различных средах. Большинство простейших – обитатели морей и пресных вод. Некоторые виды обитают во влажной почве. Множество простейших паразитируют в других организмах. Большинство простейших – мелкие организмы. Их средние размеры измеряются несколькими десятками микрометров (1 мкм равен 0,001 мм).

Самые мелкие простейшие – внутриклеточные паразиты достигают всего 2–4 мкм, а длина самых крупных видов, например некоторых грегаринов, может достигать 1000 мкм. Ископаемые раковинные корненожки, например нуммулиты, в диаметре достигали 5–6 см и более. Форма тела простейших чрезвычайно разнообразна.

Простейшие – это эукариотические одноклеточные микроорганизмы, являются одноклеточными животными. Снаружи окружены мембраной (пелликулой) – аналогом цитоплазматической мембраны клеток животных. Содержат ядро с ядерной оболочкой и ядрышком, цитоплазму, состоящую из эндоплазматического ретикулума, митохондрий, лизосом, многочисленных рибосом и др. Размеры колеблются от 2 до 100 мкм.

Среди них имеются виды с непостоянной формой тела, например амёбы. Разнообразны типы симметрии у простейших. Широко распро-

странены формы с радиальной симметрией: радиолярии, солнечники. Это в основном плавающие планктонные простейшие. Двусторонняя симметрия наблюдается у некоторых жгутиковых. Поступательно-вращательная симметрия характерна для фораминифер со спирально закрученной раковиной. У некоторых видов наблюдается метамерия – повторяемость структур по продольной оси.

Разнообразны жизненные формы простейших, или морфоадаптивные типы. Строение клетки простейших характеризуется всеми основными признаками клеточного строения эукариот. Ультраструктура строения простейших изучена биологами благодаря использованию электронно-микроскопической техники.

Разрешающие способности современного электронного микроскопа позволяют получать увеличение в 200–300 тыс. раз. Клетка простейших типична для эукариотных организмов и состоит из цитоплазмы и одного или нескольких ядер. Цитоплазма ограничена снаружи трехслойной мембраной.

Общая толщина мембраны около 7,5 нанометров ( $1 \text{ нм} = 10^{-6} \text{ мм}$ ). В цитоплазме простейших различают наружный, более прозрачный и плотный слой – эктоплазму и внутренний, зернистый слой – эндоплазму. В эндоплазме сосредоточены все основные органеллы клетки: ядро, митохондрии, рибосомы, лизосомы, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи и др.

Кроме того, у простейших имеются особые органеллы: опорные, сократительные фибриллы, пищеварительные и сократительные вакуоли и др. Ядро покрыто двухслойной мембраной с порами. Внутри ядра находится карิโอплазма, в которой распределены хроматин и ядрышки.

Хроматин представляет собой деспирализованные хромосомы, состоящие из ДНК и белков типа гистонов. Ядрышки подобны рибосомам и состоят из РНК и белков. Ядра простейших разнообразны по составу, форме, размерам. У простейших можно выделить особые функциональные комплексы органелл, которые соответствуют системам органов и тканей многоклеточных.

Простейшие имеют: органы движения (жгутики, реснички, псевдоподии), питания (пищеварительные вакуоли), внутриклеточное пищеварение происходит преимущественно в пищеварительных вакуолях, органы выделения (сократительные вакуоли); могут питаться посредством фагоцитоза или образования особых структур, например, жгутиковые – поглощают питательные вещества всей поверхностью клетки, саркодовые – питаются фагоцитозом, споровики и балантидии имеют клеточный рот.

По типу дыхания аэробы (дышат всей поверхностью тела). Ответные реакции на воздействие факторов окружающей среды осуществляются в основном в виде таксисов (движений в сторону источника раздражения или в противоположную сторону).

Некоторые простейшие имеют опорные фибриллы. Размножаются бесполом путем – двойным делением или множественным делением (шизогония), а некоторые и половым путем (спорогония). Многие при неблагоприятных условиях образуют цисты – покоящиеся стадии, устойчивые к изменению температуры, влажности и др. При окраске по Романовскому-Гимзе ядро простейших окрашивается в красный, а цитоплазма – в голубой цвет.

Многие простейшие (дизентерийная амeba, лямблии, трихомонады, лейшмании, балантидии) могут расти на питательных средах, содержащих нативные белки и аминокислоты. Для их культивирования используются также культуры клеток, куриные эмбрионы и лабораторные животные.

### **Типы питания и трофические органеллы**

По типу питания простейшие разнообразны, могут быть гетеротрофами или автотрофами. :

Среди них имеются автотрофы, способные к фотосинтезу. Это одноклеточные водоросли из жгутиковых, в цитоплазме которых имеются хлорофилловые зерна, или хроматофоры.

Большинство простейших гетеротрофы, питающиеся, как животные, готовыми органическими веществами. Для одних простейших характерен голозойный способ питания (они поглощают твердые частицы пищи), для других – сапрофитный (эти простейшие поглощают растворенные органические вещества). Частицы пищи заглатывают амeбы, инфузории. У них в цитоплазме образуются пищеварительные вакуоли, где происходит переваривание пищи.

Такое заглатывание твердой пищи клеткой получило название фагоцитоза. При сапрофитном способе питания пищеварительные вакуоли не образуются. Простейшие могут заглатывать жидкость через временное впячивание мембраны. При этом капля жидкости погружается в цитоплазму. Этот процесс называют пиноцитозом.

Некоторые виды обладают смешанным типом питания (миксотрофы). Они способны к фотосинтезу, как растения, и к питанию готовым органическим веществом, как животные. У них имеются в цитоплазме хлорофилловые зерна, но могут образовываться и пищеварительные вакуоли. К таким простейшим со смешанным типом питания относятся,

например, эвглены, питающиеся на свету, как растения, а в темноте – как животные.

### **Органеллы выделения и осморегуляции**

Выделение и осморегуляция осуществляются у простейших сократительными вакуолями. Они имеются только у пресноводных форм и отсутствуют у морских и паразитических видов, живущих в изотонической среде. Сократительная вакуоль в простейшем случае представляет собой пузырек в цитоплазме, регулярно заполняющийся жидкостью, которая затем удаляется наружу через пору в мембране клетки.

Постоянное удаление избытка воды из клетки позволяет регулировать осмотическое давление в цитоплазме. Выделение продуктов обмена происходит у большинства простейших через поверхность клетки, а также через сократительную вакуоль, если она имеется. Особых органелл дыхания у них нет, и они поглощают кислород через клеточную мембрану.

### **Ядерный аппарат**

Ядерный аппарат состоит из одного или нескольких ядер. Ядра регулируют обменные процессы клеток простейших и обеспечивают размножение. Ядра простейших варьируют по форме, числу, плоидности, функциям. У некоторых многоядерных простейших различают два типа ядер: генеративные и вегетативные.

Это явление получило название ядерного дуализма. Вегетативные ядра регулируют все жизненные процессы в клетке, а генеративные участвуют в половом процессе. Ядерный дуализм характерен для инфузорий, некоторых фораминифер. Ядра простейших могут быть гаплоидными на определенном этапе жизненного цикла, или диплоидными, или полиплоидными. Большинство простейших – одноядерные (моноэнергидные). Виды, у которых много ядер, называют полиэнергидными. При бесполом размножении простейших ядра делятся путем митоза. Ядра простейших, для которых известен половой процесс, претерпевают мейоз, или редукционное деление.

В отличие от многоклеточных мейоз у одноклеточных разнообразен. В примитивном случае мейоз осуществляется в процессе одного деления клетки, в других, как у высших животных, в результате двух последовательных делений.

В одних случаях редукционное деление происходит после образования зиготы (зиготическая редукция), в других, как у многоклеточных, – при формировании гамет (гаметическая редукция).

## Типы размножения простейших

Типы размножения простейших разнообразны. Им свойственно бесполое и половое размножение. Бесполое размножение осуществляется путем деления клетки на две или множество клеток (агамогония) при митотическом делении ядер.

Половое размножение простейших характеризуется образованием половых клеток – гамет (гамогония) с их последующим слиянием (копуляция), что приводит к формированию зиготы, из которой развивается новый дочерний организм. У некоторых простейших (например, инфузорий) половой процесс – конъюгация происходит путем слияния не гамет, а генеративных ядер из разных клеток.

При процессе копуляции сливающиеся гаметы могут быть одинаковыми по размеру и форме (изогамия) или разными (гетерогамия). В случае резких различий между гаметами, когда одна из гамет крупная, неподвижная, без жгутиков (оогамета), а другая мелких размеров, со жгутиками, такая копуляция получила название оогамии.

При этом макрогамета (оогамета) приравнивается к яйцеклетке многоклеточных, а микрогамета – к спермию.

## Жизненный цикл простейших

Жизненный цикл простейших представляет собой циклически повторяющийся отрезок развития вида между двумя одноименными фазами (например, от зиготы до зиготы).

Жизненный цикл простейших может характеризоваться только бесполом типом размножения (от деления до деления), или только половым размножением (от зиготы до зиготы), или чередованием полового и бесполого размножения (метегенез).

## Классификация простейших

Классификация основана на морфологии и способах движения. Простейшие относят к Царству *Animalia* – животные; Подцарство: *Protozoa* – одноклеточные.

Согласно современным концепциям, в протозоологии простейшие подразделены на семь типов:

- Тип Саркомастигофоры (*Sarcomastigophora*) – 25 тыс. видов,
- Тип Апикомплексы (*Apicomplexa*) – 4800 видов,
- Тип Микроспоридии (*Microspora*) – 800 видов,
- Тип Миксоспоридии (*Myxozoa*) – 875 видов,
- Тип Инфузории (*Ciliophora*) – 7500 видов,

Тип Лабиринтулы (*Labyrinthomorpha*) – 35 видов,

Тип Асцетоспоровые (*Ascetospora*) – 30 видов.

В основу подразделения простейших на типы положены принципы строения их ядерного аппарата, органелл движения, ряда микроструктур, типов размножения и жизненных циклов. В сравнительном аспекте характеристика типов простейших представлена в таблице 4.

Таблица 4. Сравнительная характеристика типов простейших

Типы	Органеллы движения	Ядерный аппарат	Половой процесс	Споры	Образ жизни
Саркомастигофоры ( <i>Sarcomastigophora</i> )	Жгутики, псевдоподии	Одноядерные, многоядерные	Копуляция гамет	Нет	Свободноживущие
Апикомплексы ( <i>Apicomplexa</i> )	Жгутиковые гаметы	Одноядерные, многоядерные	Копуляция гамет	Многоклеточные со спорозоидами	Паразиты
Микспоридии ( <i>Mixozoa</i> )	Нет	Многоядерные с дуализмом	Автогамия	Многоклеточные с полярными капсулами	Паразиты
Микроспоридии ( <i>Microspora</i> )	Нет	Одноядерные	Автогамия	Одноклеточные с полярной нитью	Паразиты
Инфузории ( <i>Ciliophora</i> )	Реснички	Многоядерные с дуализмом	Конъюгация	Нет	Свободноживущие, паразиты
Асцетоспоридии ( <i>Ascetospora</i> )	Нет	Многоядерные без дуализма	Нет	Многоклеточные без полярных капсул	Паразиты
Лабиринтулы ( <i>Labyrinthomorpha</i> )	Жгутиковые зооспоры	Многоядерные в многоклеточной структуре коллоний	Нет	Нет	Свободноживущие

## Тип саркомастигофоры (*Sarcomastigophora*)

Этот тип объединяет амебодных простейших – саркодовых и жгутиконосцев. Ранее эти группы резко противопоставлялись по органеллам движения. В настоящее время их объединили в один тип в связи с тем, что между саркодовыми и жгутиковыми имеются переходные формы, обладающие сразу двумя типами органелл (*Mastigamoeba*).

Кроме того, нередко наблюдается смена типов органелл в процессе жизненного цикла (гаметы со жгутиками, а взрослые формы – с псевдоподиями). У саркомастигофор может быть одно или несколько одинаковых ядер.

Исключение составляют лишь некоторые многоядерные фораминиферы с разными ядрами. Половой процесс – копуляция, но большинство видов размножаются только бесполом путем. Согласно современной системе, саркомастигофор подразделяют на три подтипа: подтип Жгутиковые (*Mastigophora*), Опалины (*Opalinata*) и Саркодовые (*Sarcodina*).

### Подтип жгутиконосцы (*Mastigophora*)

Жгутиконосцы – обширная и многообразная группа простейших, насчитывающая около 8 тыс. видов. Размеры их составляют 150–300 нм в диаметре и 20–2000 мкм в длину. Они обитают в морях, пресных водах, в почве, а также в организмах животных и растений. Среди жгутиконосцев немало опасных паразитов животных и человека.

Значение их в природе чрезвычайно велико. Многие жгутиконосцы составляют основу планктона в водоемах и играют важную роль в биогеоценотическом круговороте в биоценозах.

Зеленые жгутиконосцы – продуценты органического вещества, а гетеротрофные виды, будучи консументами и редуцентами, участвуют в переработке и дальнейшей минерализации органики. Жгутиконосцы – важное звено в цепях питания водных экосистем и служат объектом питания для более крупных организмов. Некоторые виды жгутиконосцев – полезные симбионты животных.

Подтип жгутиконосцев характеризуется следующими морфологическими особенностями:

1. Органеллами движения им служат жгутики – выросты цитоплазмы. Их может быть 1, 2, 4, 8 или множество.

2. У жгутиконосцев имеется пелликула, реже выделяется панцирь. Поэтому у большинства жгутиковых форма тела постоянная.

3. Жгутиконосцам свойственны разнообразные способы питания. Среди них имеются автотрофы, способные к фотосинтезу, гетеротрофы – с животным питанием, а также миксотрофы, сочетающие животный и растительный способы питания.

4. Размножение чаще бесполое, путем продольного деления, реже наблюдается половое размножение с образованием гамет с последующей копуляцией. Им свойственна зиготическая редукция хромосом.

По характеру питания жгутиконосцев подразделяют на два класса: класс Растительные жгутиконосцы (*Phytomastigophorea*) и класс Животные жгутиконосцы (*Zoomastigophorea*).

Размеры жгутиконосцев варьируют от 1–2 мкм до нескольких миллиметров. Форма тела может быть овальной, веретеновидной, бутылковидной.

Однако у большинства жгутиковых имеется пелликула, а у некоторых видов образуется панцирь, состоящий из клетчатки или из хитиноидного органического вещества.

В ряде случаев жгутиконосцы выделяют пластинки из минеральных веществ на поверхность клетки. Жгутиковый аппарат разнообразен по числу и форме жгутиков, а также их расположению. Жгутики могут иметь вспомогательные структуры. У некоторых видов жгутик тянется вдоль всего тела клетки, образуя ундулирующую мембрану.

Движение жгутика обычно винтообразное, и тело клетки жгутиконосцев как бы ввинчивается в толщу жидкости. Иногда жгутики движутся в одной плоскости. Ультраструктура жгутика, по данным электронной микроскопии, довольно сложная. Жгутик состоит из наружной части – бича и базальной части – кинетосомы, находящейся в эктоплазме клетки.

Снаружи жгутик покрыт трехслойной мембраной, а внутри его располагаются 11 фибрилл.

В центре жгутика располагаются 2 центральные фибриллы, а по периферии размещаются 9 фибрилл, каждая из которых состоит из двух спаянных микротрубочек.

Центральные фибриллы выполняют опорную функцию, а периферические – локомоторную. Кинетосома цилиндрической формы, покрыта мембраной. В кинетосоме имеется особая аксиальная гранула, к которой прикрепляются центральные фибриллы жгутика. Периферические девять фибрилл продолжают в кинетосоме, только становятся более сложными и состоят уже не из двух, а из трех спаянных микротрубочек. Центральные фибриллы в кинетосоме ниже аксиальной гранулы отсутствуют.

Рядом с базальным тельцем (кинетосомой) может располагаться особая органелла – кинетопласт (парабазальное тельце), который по своей функции соответствует митохондрии и обеспечивает генерацию энергии жгутику.

В состав кинетопласта дополнительно входит значительное количество ДНК. У части видов жгутиконосцев у основания жгутика может находиться еще и парабазальное тельце, или блефаропласт, содержащий запас резервных веществ, расходуемых жгутиком при движении. По своему строению парабазальное тельце близко к аппарату Гольджи.

Внутри клетки жгутиконосцев имеется ядро, а также другие органеллы. У зеленых жгутиконосцев в цитоплазме располагаются хроматофоры, содержащие хлорофилл.

В результате происходящего фотосинтеза в клетке автотрофных жгутиконосцев накапливаются резервные питательные вещества: зерна парамила, близкого к крахмалу, капельки жироподобных веществ. Гетеротрофные жгутиконосцы способны либо к голозооному питанию – заглатывание органических частиц пищи, либо к сапрофитному – всасывание жидкой органической пищи всей поверхностью клетки. У основания жгутика у ряда видов имеется клеточный рот, а в цитоплазме образуются пищеварительные вакуоли.

У пресноводных жгутиконосцев часто имеется сократительная вакуоль, иногда с большим резервуаром, открывающимся наружу порой. Зеленые жгутиконосцы, как правило, имеют красный «глазок» – стигму, представляющую собой светочувствительную органеллу. У жгутиконосцев со стигмой хорошо выражен положительный фототаксис, т. е. проявляется избирательность к освещенным участкам водоема, где наиболее эффективно происходит фотосинтез.

Большинство жгутиковых размножается бесполом способом, путем продольного деления клетки на две дочерние. При этом ядро делится путем митоза. Делятся надвое базальное и парабазальное тельца, жгутик же переходит к одной из дочерних клеток, а у другой образуется заново. У колониальных жгутиконосцев бесполое размножение колоний может происходить двумя способами.

При монотомическом делении образующиеся дочерние клетки сразу вырастают до размеров материнских клеток. В делящейся колонии число клеток увеличивается, а затем она перешнуровывается надвое (*Synura*). При палинтомическом делении из каждой материнской клетки колонии путем многократного деления возникает новая дочерняя колония, состоящая из мелких клеток (*Pandorina*, *Volvox*).

В дальнейшем каждая дочерняя колония растет и достигает размеров материнской колонии. Половое размножение известно для немногих

жгутиконосцев, в основном для растительных видов. При этом формируются жгутиковые гаметы, которые, сливаясь, образуют зиготы, из которых появляются взрослые формы.

У жгутиконосцев может быть изогамия (равногаметность) или анизогамия (разногаметность). Например, у *Volvox* крупные гаметы лишены жгутиков и потому напоминают яйцеклетку. В жизненном цикле *Volvox* наблюдается чередование полового и бесполого размножения.

### Подтип саркодовые (*Sarcodina*)

Это простейшие без постоянной формы тела, так как покрыты лишь мембраной и не имеют уплотненных оболочек, но могут выделять раковину или внутренний скелет. Передвигаются при помощи псевдоподий или за счет циркуляции цитоплазмы.

Жгутики могут присутствовать лишь на кратковременной стадии развития (гаметы, агаметы, зооспоры). Для большинства видов известно лишь бесполое размножение: простое деление надвое или множественное. Половой процесс известен для немногих и осуществляется путем копуляции жгутиковых или амебодных гамет. Большинство саркодовых – свободноживущие виды, которые обитают в морях, пресных водах, во влажной почве. Редко среди них встречаются паразиты животных и человека.

Среди саркодовых четко выделяются три класса: класс Корненожки (*Rhizopoda*), класс Лучевики (*Radiolaria*) и класс Солнечники (*Heliozoa*). Они хорошо различаются по форме псевдоподий, скелетным образованиям, жизненным циклам и экологическим особенностям. Псевдоподии саркодовых могут быть лопастевидными (лобоподии), нитевидными (филоподии), ветвистыми (ризоподии) и лучеподобными с опорными микротрубочками (аксоподии).

### Класс корненожки (*Rhizopoda*)

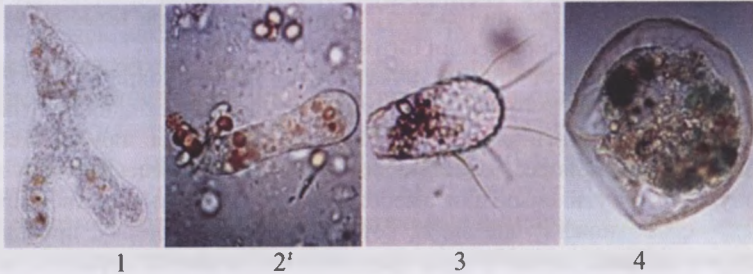
Для корненожек характерны псевдоподии типа лобоподии или ризоподий, подобных ветвящимся корням растений. Отсюда возникло название класса – корненожки. У многих корненожек имеется скелет в форме раковины, органический или минеральный.

Для большинства видов характерно бесполое размножение, только у некоторых наблюдается чередование полового и бесполого размножения. К классу Корненожек (*Rhizopoda*) относятся: отряд Амебы (*Amoebina*), отряд Раковинные амебы (*Testacea*), отряд Фораминиферы (*Foraminifera*).

## Отряд Амебы (*Amoebina*)

Амебы лишены скелета; ложноножки типа лобоподии, которые варьируют по форме у разных видов. Снаружи они покрыты эластичной мембраной – плазмолеммой. Амебы живут в воде или во влажной почве, где питаются одноклеточными водорослями и бактериями.

Некоторые виды паразитируют у человека и животных (рис. 49). Типичным представителем отряда является пресноводная амеба – протей (*Amoeba proteus*). Это довольно крупный вид амебы, размер которой достигает до 500 мкм. При движении форма тела амебы постоянно меняется, образуются новые псевдоподии. Внутри клетки имеются ядро, сократительная вакуоль и множество пищеварительных вакуолей.



**Рисунок 49** – Паразиты человека и животных отряда *Amoebina*:  
1 – амеба-протей, 2 – дизентерийная амеба,  
3 – эвглифа, 4 – арцелла

При движении амеба как бы обволакивает пищевые частицы, которые затем оказываются внутри цитоплазмы. Цитоплазма выделяет вокруг пищевого комка пищеварительный сок. Так образуется пищеварительная вакуоль. После переваривания пищи из вакуоли через мембрану клетки удаляются непереваренные остатки. Заглатывание твердой пищи называется фагоцитозом.

Кроме фагоцитоза, амебе свойствен пиноцитоз – заглатывание жидкости. При этом на поверхности клетки образуются впячивания в форме трубочки, по которой поступает внутрь цитоплазмы капля жидкости. Образующаяся вакуоль с жидкостью отшнуровывается от трубочки.

После всасывания жидкости вакуоль исчезает. Процесс пиноцитоза можно изучать лишь при помощи электронной микроскопии. Сократительная вакуоль обычно одна, реже две. Они поддерживают постоянство осмотического давления внутри клетки. У морских и паразитических амеб сократительных вакуолей нет. Амебы при неблагоприятных условиях инцистируются.

Они выделяют вокруг себя плотную оболочку и превращаются в покоящуюся фазу – цисту. Цисты переносят высыхание, действие низких и высоких температур. Они обеспечивают выживаемость вида, а также расселение. Цисты переносятся течением, а также ветром на большие расстояния. При благоприятных условиях амёбы выходят из цист и снова ведут активный образ жизни.

В кишечнике человека и домашних животных обитает множество видов амёб. Часть из них не причиняет вреда хозяевам, так как является их квартирантами (комменсалами).

К таким безвредным сожителям человека относится *Entamoeba coli*, питающаяся содержимым кишечника и обитающими в нем бактериями. Но среди кишечных амёб имеются и паразитические виды, например *E. histolytica*, возбудитель кишечной амёбиазы.

Отряд Раковинные амёбы (*Testacea*). Это свободноживущие амёбы, имеющие раковину. Раковины *Testacea* могут состоять из органического рогоподобного вещества, нередко инкрустированного песчинками. Они живут в пресной воде, болотной почве, в сфагновых мхах. Их численность в почве может быть очень высокой.

Они имеют большое значение для почвообразования. Наиболее часто в болотистой почве встречаются *Diffflugia*, *Arcella*. Размножаются *Testacea* делением клетки надвое. При этом одна дочерняя клетка остается в материнской раковине, а другая строит новую.

### Отряд Фораминиферы (*Foraminifera*)

Фораминиферы – морские раковинные корненожки (рис. 50). Это самая многочисленная группа саркодовых. Фораминиферы встречаются во всех морях и особенно многообразны на глубинах 100–200 м. Они входят в состав бентоса, ведут ползающий образ жизни.

Редкие виды фораминифер, например, из рода *Globegirina*, ведут планктонный образ жизни. Раковины фораминифер бывают трех типов: органические (из псевдохитина), инкрустированные песчинками, и известковые. Это наружный скелет, выделяемый эктоплазмой клетки.

Наиболее распространены известковые раковины. Размеры раковин варьируют от 20 мкм до 5–6 см. Известковые раковины фораминифер могут быть однокамерными или многокамерными, с устьем. Перегородки между камерами пронизаны отверстиями, и цитоплазма клетки представляет единое целое. Стенки раковин могут быть с отверстиями. Через устье раковины и отверстия в ее стенке выступают тонкие ветвящиеся ризоподии.



Чередование полового и бесполого размножения в жизненном цикле видов получило название метазенеза. В жизненном цикле фораминифер происходит чередование гаплоидного и диплоидного поколений. Агамонты, развивающиеся из зиготы, диплоидны. В процессе агамогонии одно из первых делений ядра – мейоз. Из раковин фораминифер слагаются слои известняка, мела и некоторых других пород. Фораминиферы известны в ископаемом состоянии с кембрия.

Всего насчитывают около 30 тыс. ископаемых видов фораминифер. Из раковин крупных видов фораминифер – нуммулитов, размеры которых достигали 5–16 см, состоят нуммулитовые известняки. Из них построены египетские пирамиды, многие дворцы и старинные здания в столицах европейских государств и в нашей стране. Ископаемые фораминиферы используются геологами как индикаторы нефтеносных пластов, поскольку в них обитают некоторые виды фораминифер.

### Класс радиоларии, или лучевики (*Radiolaria*)

Радиоларии – исключительно морские планктонные саркодовые. Насчитывается 7–8 тыс. видов радиоларий.

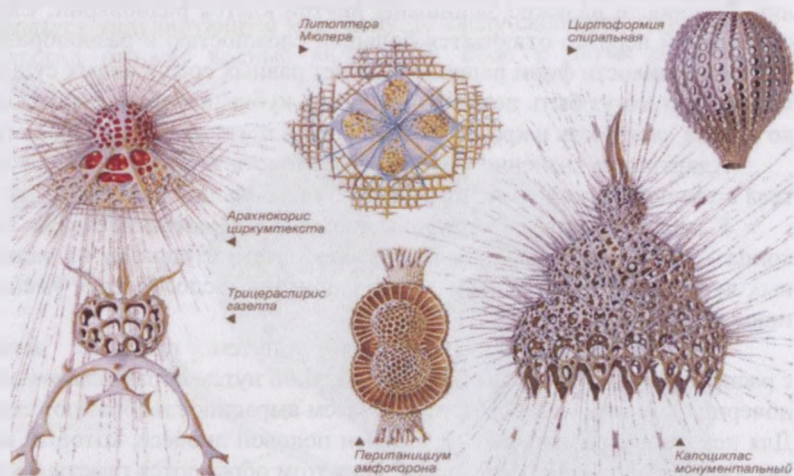


Рисунок 51 – Радиоларии

Еще больше видов известно в ископаемом состоянии. Большинство радиоларий обладают радиальной симметрией, что связано с приспособлениями к парению в толще воды. В отличие от фораминифер у радиоларий скелет внутренний, выделяемый центральной цитоплазмой. Обра-

зуются центральная скелетная капсула и радиальные иглы (рис. 51). Скелет радиолярий состоит из сульфата стронция ( $\text{SrSO}_4$ ) или из оксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ).

Псевдоподии представлены тонкими радиальными нитями. Цитоплазма подразделяется на внутрикапсулярную, содержащую одно или несколько ядер, и внекапсулярную, сильно вакуолизованную.

Стенка центральной капсулы пронизана многочисленными порами, через которые проходят цитоплазматические нити, связывающие внутрикапсулярную и внекапсулярную цитоплазму. От внутрикапсулярной плазмы отходят лучевидные псевдоподии – аксоподии с осевыми микротрубочками внутри. Поверхностный слой цитоплазмы образует тонкие нитевидные псевдоподии – филоподии, иногда анастомозирующие друг с другом.

Аксоподии увеличивают плавательную поверхность радиолярий, а филоподии в основном служат для улавливания пищевых частиц. Внутри цитоплазмы радиолярий нередко содержатся симбионты – одноклеточные водоросли, поглощающие углекислый газ.

Радиолярии используют выделяемый водорослями кислород для дыхания и также частично их переваривают в пищеварительных вакуолях. Водоросли надежно защищены внутри клеток радиолярий. Скелет радиолярий нередко отличается большой сложностью и разнообразием. По причудливости форм радиоляриям нет равных среди живых существ. Их скелеты могут быть похожи на короны, кубки, ажурные шары. Однако вся эта сложность и красота форм скелета погружена в цитоплазму.

Адаптивное значение скелета – прочность и поддержание формы тела в толще морской воды, в том числе и на больших глубинах.

К скелетным иглам нередко прикрепляются сократительные волокна – миофриски. Их сокращение натягивает цитоплазму на радиальных лучах, увеличивая объем тела радиолярий и способствуя уменьшению его удельного веса.

Радиолярии размножаются либо путем простого деления с распределением скелетных элементов, либо путем образования мелких дочерних клеток – зооспор, которые затем вырастают и образуют скелет. Для некоторых радиолярий характерен половой процесс, который впервые был открыт В. Т. Шевяковым. При этом образуются гаметы со жгутиками. Из зиготы формируется радиолярии.

Радиолярии образуют осадочные породы – радиоляриты: кремнистые глины, сланцы, трепел, яшмы. Кремниевые породы протозойного происхождения находят большое практическое применение: трепел используется для шлифовки, яшмы, опалы представляют собой полудрагоценные камни. Радиолярии – древняя группа простейших, известная с

кембрия. Многие виды древних радиолярий используются в стратиграфии как руководящие формы.

### Класс животные жгутиконосцы (*Zoomastigophorea*)

Этот класс включает гетеротрофных жгутиконосцев. Среди них большинство паразиты животных и растений. Отряд Воротничковые жгутиконосцы (*Choanoflagellida*). Это морские одиночные и колониальные жгутиковые. Для них характерно наличие одного жгутика, окруженного воронкой – воротничком из микроворсинок. Это приспособление для захвата пищи. Движением жгутика жгутиконосец загоняет пищевые частицы в воротничок, которые затем погружаются в цитоплазму клетки, где перевариваются в пищеварительных вакуолях.

Колонии воротничковых жгутиковых могут быть шаровидными или прикрепленными древовидными. Отряд Кинетопластиды (*Kinetoplastida*). Кинетопластиды – в своем большинстве эндопаразиты животных, реже – свободноживущие виды и паразиты растений. Им свойственно наличие кинетопласта, находящегося у основания кинетосомы жгутика. Кинетопласт значительно крупнее кинетосомы и хорошо заметен под световым микроскопом. Жгутиков один, реже два. Нередко жгутик образует ундулирующую мембрану. К числу свободноживущих кинетопластид относят водные виды рода *Bodo* с двумя жгутиками (рис. 52).

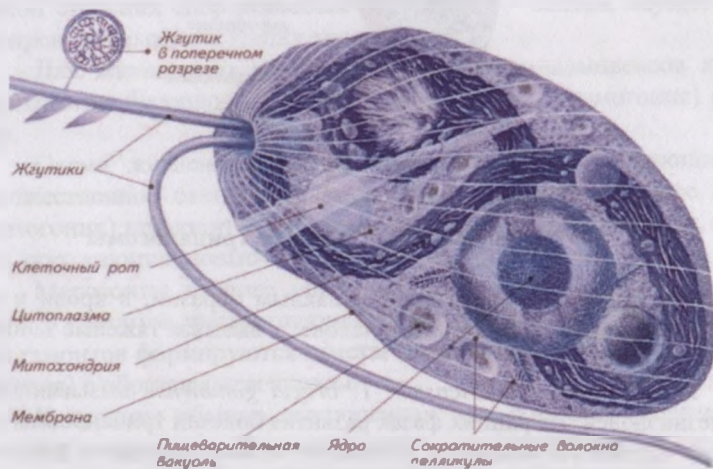
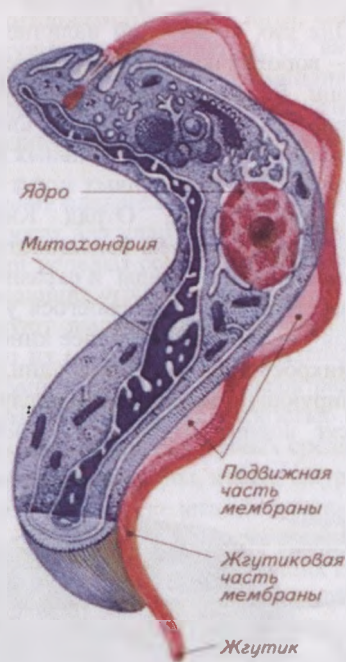


Рисунок 52 – Бодо – гетеротрофный жгутиконосец – по форме и по строению тела похож на автотрофного жгутиконосца – хламидомонаду

На растениях паразитируют виды рода *Leptomonas*, обитающие в сосудах с млечным соком. Лептомонасы продолговатой формы со жгутиком на переднем конце клетки.

Опасными паразитами человека и животных являются виды трипаносом (*Trypanosoma*). Их тело лентовидное с одним жгутиком, отходящим от заднего конца тела (рис. 53).



**Рисунок 53 – Строение трипаносомы**

Трипаносомы паразитируют, главным образом, в крови и спинномозговой жидкости животных и человека, вызывая тяжелые заболевания – трипаносомозы.

*Trypanosoma rhodesiense* и *T. brucei gambiense* вызывают сонную болезнь людей. На ранних фазах развития болезни трипаносомы живут в крови человека и вызывают лихорадку, затем переходят в спинномозговую жидкость, что приводит к нервному расстройству, сонливости, а в дальнейшем наступает смерть больного от истощения.

## Тип апикомплексы (*Apicomplexa*)

Это большая группа паразитических простейших, насчитывающая около 4800 видов.

Среди них много опасных паразитов человека и животных. К апикомплексам относятся исключительно паразитические простейшие, в большинстве случаев образующие особую фазу развития – спору, которая служит для расселения паразита во внешней среде при переходе от одного хозяина к другому.

Ранее апикомплексы объединяли с другими группами паразитических простейших, образующих споры: микоспоридиями (*Myxozoa*), микроспоридиями (*Microspora*) и аскетоспоридиями (*Ascetospora*), которые теперь выделены в самостоятельные типы.

Выяснилось, что споры всех указанных групп простейших имеют принципиальные различия в строении. Это пример конвергентного развития паразитических простейших.

Но они существенно отличаются между собой по особенностям размножения и жизненного цикла и ряду морфологических характеристик. Апикомплексы отличаются от свободноживущих простейших отсутствием органелл движения на протяжении большей части жизненного цикла. Только на фазе гамет у апикомплексов появляются жгутики.

По сравнению с паразитическими спорообразующими простейшими апикомплексы отличаются особым типом жизненного цикла, спецификой строения спор и особых ранних фаз – зоитов, осуществляющих внедрение паразита в клетку хозяина.

Для жизненного цикла большинства апикомплексов характерно чередование бесполого (агамония) и полового (гамония) размножения.

Схема жизненного цикла складывается из следующих этапов. Множественное бесполое размножение паразитов на фазе агамонтов (шизогония) приводит к образованию мерозоитов – молодых фаз развития, поражающих новые клетки хозяина.

Мерозоиты позднее образуют поколение половых особей паразитов – гамонтов, размножающихся половым путем. В результате деления гамонтов формируются гаметы (гамония), которые сливаются (копуляция) с образованием зиготы.

Копуляция обычно гетерогамная или оогамная. Жгутик имеется только у микрогамет. В дальнейшем зигота претерпевает дополнительное множественное бесполое размножение с образованием спорозоитов (спорогония).

При этом происходит зиготическая редукция хромосом. Шизогония обеспечивает увеличение численности паразита внутри хозяина; гамогония и последующая спорогония способствуют увеличению числа паразитов на расселительной фазе развития (ооцисты со спорами).

Ооцисты и споры покрыты плотными оболочками, защищающими клетки споровиков (спорозиты) от внешних воздействий. У некоторых споровиков наблюдается смена хозяев в жизненном цикле.

Итак, для апикомплексов характерно: отсутствие оргanelл движения, сложный жизненный цикл с чередованием агамогонии (шизогонии), гамогонии и спорогонии, наличие фаз проникновения в хозяина – зоитов и расселительных фаз – ооцист со спорами и спорозитами.

У отдельных споровиков имеются отклонения в сторону усложнения или упрощения жизненного цикла. Тип Апикомплексы (*Apicomplexa*) в настоящее время подразделяют на два класса: класс Перкинсеи (*Perkinsea*) – со слабо выраженным апикальным комплексом и отсутствием полового процесса и класс Споровики (*Sporozoa*) – с совершенным апикальным комплексом и наличием полового процесса.

### Класс споровики (*Sporozoa*)

Класс Споровики (*Sporozoa*) включает отряд Грегарины (*Gregarinida*) и отряд Кокцидии (*Coccidia*).

### Отряд Кокцидии (*Coccidia*)

Кокцидии – внутриклеточные паразиты, в основном позвоночных и редко беспозвоночных животных. Всего известно более 400 видов этого отряда. Клетка кокцидии округлая, недифференцированная на отделы, как у грегариин. Это в основном очень мелкие формы, размеры которых достигают всего нескольких микрометров.

Заболевания, вызываемые кокцидиями, называются кокцидиозами. Кокцидиозам подвержены главным образом молодые животные. От кокцидиоза наиболее часто страдают кролики, овцы, телята, куры. Кокцидии паразитируют в клетках стенок кишечника.

Среди эймериевых кокцидий опасность для человека представляет токсоплазма (*Toxoplasma gondii*).

Заболевание, вызываемое этим паразитом, называется токсоплазмозом, который широко распространен по всему миру. Токсоплазма может через плаценту передаваться плоду млекопитающих и человека, что вызывает обычно гибель потомства (трансплацентарная инвазия).

Подотряд Кровяные споровики (*Haemosporina*). Кровяные споровики – специализированные внутриклеточные паразиты крови млекопитающих, птиц и рептилий.

Они поражают эритроциты крови. Некоторые виды рода *Plasmodium* паразитируют у человека, вызывая опасную болезнь малярию. Полностью жизненный цикл малярийного плазмодия – описан итальянским зоологом Грасси. Жизненный цикл малярийного плазмодия (*Plasmodium vivax*) характеризуется сменой хозяев и чередованием поколений с половым и бесполом размножением.

Перенос паразита осуществляется малярийными комарами рода *Anopheles*, которые являются окончательными хозяевами плазмодия. Человек – промежуточный хозяин малярийного плазмодия.

### Тип инфузории (*Ciliophora*)

Инфузории характеризуются наличием двигательных органелл – ресничек, ядерным дуализмом и особой формой полового процесса – конъюгацией.

Всего известно 7500 видов. Большинство инфузорий – свободноживущие морские и пресноводные простейшие. Реже среди них встречаются симбионты и паразиты различных животных. Инфузории – высокоорганизованные простейшие с наиболее сложной системой органелл. Клетка инфузории покрыта пелликулой, обеспечивающей постоянство формы тела.

Пелликула состоит из плазматической мембраны и уплотненного периферического слоя цитоплазмы, в котором располагаются в мозаичном порядке особые мешочки – альвеолы. Под пелликулой находится эктоплазма, в которую погружены многие другие органеллы.

Прежде всего это кинетосомы – базальные тельца ресничек. От базальных телец отходят три корневые структуры: кинетодесма и два пучка микротрубочек. Они обеспечивают синхронность веслообразных движений ресничек. Совокупность пелликулы и эктоплазмы со всеми структурами образует опорный комплекс – кортекс клетки инфузории.

При помощи электронной микроскопии удалось получить трехмерные реконструкции кортекса инфузорий. Структуры кортекса видоспецифичны и используются в систематике. Реснички инфузорий имеют сходное строение со жгутиками.

В центре реснички имеют две микротрубочки (фибриллы) и девять двойных групп микротрубочек по периферии: в кинетосоме центральные фибриллы исчезают, а периферические становятся тройными. Ресничный аппарат у инфузорий разнообразен.

Реснички могут склеиваться в пучки – цирры, в пластинки – мембранеллы или мембраны. Особо сложный ресничный аппарат около рта. В зависимости от образа жизни инфузорий их форма тела и адаптации ресничного аппарата сильно варьируют. Многие плавающие инфузории имеют обтекаемую форму тела и равномерное распределение ресничек (инфузория-туфелька – *Paramecium*).

Сидящие и прикрепляющиеся инфузории нередко имеют форму трубы или колокольчика. На расширенном конце тела около рта обычно располагаются длинные реснички, или мембранеллы (сувойка – *Vorticella*, трубоч – *Stentor*). Ползающие инфузории уплощены и снабжены особыми «ножками» – циррами (стилониция – *Stylonichia*).

В эктоплазме инфузорий могут находиться сократительные волокна – мионемы или защитные органеллы – трихоцисты, которые при раздражении «выстреливают» и превращаются в упругую нить. «Выстреливание» множества трихоцист способно поразить врага из микромира, оказывая парализующее действие.

У многих инфузорий имеется сложная система органелл пищеварения. Рот нередко расположен во впадине тела – воронке (перистом), окруженной длинными ресничками, или мембранеллами.

При помощи ресничек пища загоняется в рот (цистостом). Нередко рот переходит в длинную глотку (цитофаринкс), погруженную в эндоплазму.

Пищевые комочки, попавшие в эндоплазму, тотчас же окружаются мелкими пузырьками с ферментами – везикулами, что способствует разложению пищеварительных вакуолей.

В начале пищеварения в вакуолях образуется кислая среда, а на последующих фазах – щелочная, что аналогично процессам пищеварения у высших животных.

Непереваренные частицы выбрасываются из клетки в определенном месте – порошице (цитопрокт).

Некоторые хищные инфузории обладают ротовым хоботком, прокалывающим покровы одноклеточной жертвы (*Didinium*). У пресноводных инфузорий имеются сократительные вакуоли – органеллы осморегуляции и выделения.

Иногда сократительные вакуоли образуют сложную систему. Так, у инфузории-туфельки две сократительные вакуоли с 5–7 приводящими каналами каждая.

Вначале избыток жидкости собирается в лучеобразные каналы, а из них выпрыскивается в центральную вакуоль, представляющую собой резервуар, из которого затем выталкивается наружу. В эндоплазме ин-

фузорий расположен ядерный аппарат. Инфузориям свойствен ядерный дуализм.

Крупные ядра – макронуклеусы регулируют клеточный метаболизм, а мелкие ядра – микронуклеусы участвуют в половом процессе. В простейшем случае, например у инфузории-туфельки, имеется один боковидный макронуклеус и маленькое ядро – микронуклеус, а у трубочки (*Stentor*) – несколько макро- и микронуклеусов.

Макронуклеусы богаты ДНК и обладают высокой плоидностью в отличие от диплоидного микронуклеуса.

В макронуклеусах происходит синтез РНК. ДНК макронуклеуса способна и к репликации. В микронуклеусах же происходит лишь репликация ДНК перед делением, а синтез РНК не осуществляется. Инфузории размножаются бесполым путем – делением клетки надвое в поперечном направлении, причем ядро делится митотически.

Половой процесс – конъюгация не сопровождается размножением, т. е. увеличением числа особей. Перед конъюгацией в каждой особи макронуклеус распадается, а микронуклеус мейотически делится, образуя четыре гаплоидных ядра, из которых три рассасываются, а оставшееся ядро митотически делится еще на два.

Одно из этих ядер – стационарное – остается в клетке, другое – мигрирующее – переходит в другую особь. После обмена мигрирующими ядрами происходит слияние стационарного ядра с «чужим» мигрирующим ядром с образованием диплоидного ядра – синкариона.

Затем особи расходятся. Из синкариона в каждой клетке формируется макронуклеус и микронуклеус. В результате конъюгации образуется ядро двойственной природы с измененным геномом, что обеспечивает большую пластичность организма.

Иногда происходит ядерная реорганизация без конъюгации. В этом случае в одной особи образуются стационарное и миграционное ядра, которые потом сливаются; затем из ядра формируются макро- и микронуклеус.

Такой процесс называется автогамией. При этом ядро не получает двойственной наследственности, однако при мейозе всегда происходят геномные мутации, что приводит к возникновению измененного генотипа.

Образование макро- и микронуклеуса из синкариона происходит следующим образом. Синкарион митотически делится 1, 2 или 3 раза, и часть ядер преобразуется в макро-, а другая – в микронуклеусы. В макронуклеусах идет повторная репликация молекул ДНК и происходит повышение плоидности. Масса ядер при этом возрастает. Многоядерная

инфузория делится с распределением макронуклеусов и дополнительным делением микронуклеусов.

В настоящее время существует несколько систем этого многочисленного типа простейших. Инфузории делятся на два класса: класс Ресничные инфузории (*Ciliata*) и класс Сосущие инфузории (*Suctorina*).

### Класс ресничные инфузории (*Ciliata*)

Класс ресничных – центральный, наиболее многочисленный класс инфузорий, который включает около 20 отрядов, относящихся к трем подклассам (рис. 54).

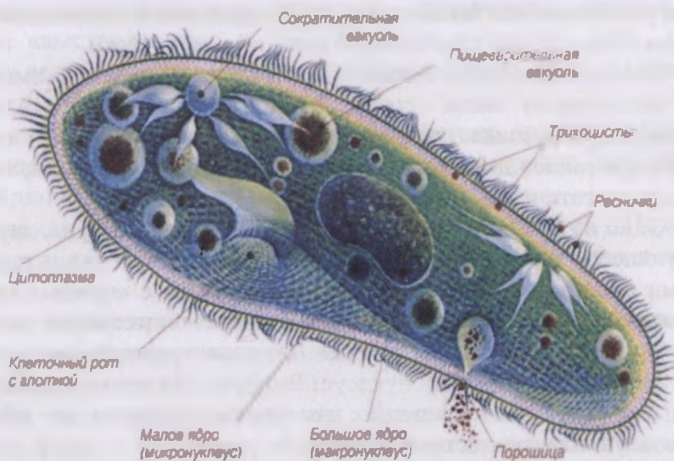


Рисунок 54 – Строение инфузории

**Подкласс круглоресничатые инфузории (*Peritricha*)** Реснички у круглоресничных располагаются только вокруг ротовой воронки, образуя левозакрученную спираль.

К этому подклассу относится одноименный отряд Перитрихиды (*Peritrichida*).

Большинство видов этого отряда ведут прикрепленный образ жизни. Типичный представитель – сувойка (*Vorticella*) (рис. 55), имеющая длинный сократимый стебелек, в котором проходит пучок мионем. При сворачивании стебелька спиралью сувойка мгновенно спасается от опасности.



**Рисунок 55** – Сувойки (*Vorticella*) – род инфузорий из семейства *Vorticellidae*

Некоторые перитрихиды живут в домиках, другие образуют колонии (*Zoothamnium*), имеющие вид пальмы. Размножаются сувойки почкованием. При этом образуется свободноплавающая форма – «бродяжка». В дальнейшем при оседании на дно у нее образуется стебелек.

Подкласс спиральноресничатые инфузории (*Spirotricha*). У спиральноресничатых спиральная полоса мембранелл, ведущая ко рту, закручена вправо.

Питаются они, загоня пищу в рот током воды, создаваемым окологротовыми мембранеллами. Отряд Энтодиниоморфы (*Entodiniomorpha*) включает инфузорий, обитающих в рубце жвачных животных. Для них характерно наличие кутикулярных пластинок и отростков на теле.

Питаются они клетчаткой и бактериями. Эти полезные симбионты не только способствуют перевариванию клетчатки, но и сами служат источником дополнительного белкового питания для жвачных животных, так как темпы размножения энтодиниоморф велики и их биомасса быстро восстанавливается.

**Отряд Разноресничные (*Heterotrichida*)** характеризуется двумя типами ресничек: мелкими, покрывающими все тело, и крупными мембранеллами в окологротовой области.

К крупным представителям отряда относятся свободноплавающие пресноводные инфузории: трубач (*Stentor*), спиростомум (*Spirostomum*) и бурсария (*Bursaria*), размеры которых могут достигать 1–2 мм в длину. Отряд Брюхоресничные (*Hypotrichida*) отличается уплощенной формой тела и наличием крупных цирр на нижней поверхности тела.

При помощи циррхипотрихи могут передвигаться по субстрату. К ним относится *Stylonychia*.

**Отряд Малоресничные (*Oligotrichida*)** включает множество видов из морского планктона. У них имеются только околоротовые реснички. Некоторые виды выделяют тонкостенную раковину.

### Значение простейших в природе и жизни человека

Простейшие, обитающие в океанах, пресных водах, почве и высших организмах, занимают важнейшее место в круговороте веществ в биосфере.

В водной среде простейшие – основа планктона, используемая в пищу другими более крупными животными. Из скелетов простейших: фораминифер, радиолярий и панцирных жгутиконосцев – кокколитофорид образуются мощные пласты осадочных пород. Многие водные простейшие – седиментаторы, питающиеся взвешенными органическими частицами и бактериями, играют существенную роль в биологической очистке вод. Почвенные амёбы, инфузории и жгутиконосцы – важное звено почвенной фауны: они принимают участие в почвообразовании.

Ряд видов простейших составляют полезную группу симбионтов высших животных, улучшают пищеварение и обменные процессы в организме. Например, малоресничные инфузории в рубце у жвачных, а жгутиковые в кишечнике термитов помогают хозяину переваривать клетчатку. Паразитические простейшие в природе представляют важный фактор естественного отбора, регулирующий численность других видов животных и растений.

Простейшие – источник питания для других животных. В морях и в пресных водах простейшие, прежде всего инфузории и жгутиковые, служат пищей для мелких многоклеточных животных. Черви, моллюски, мелкие ракообразные, а также мальки многих рыб питаются преимущественно одноклеточными. Этими мелкими многоклеточными, в свою очередь, питаются другие, более крупные организмы.

Простейшие – участники образования горных пород. Рассматривая под микроскопом размельченный кусочек обыкновенного писчего мела, можно видеть, что он состоит преимущественно из мельчайших раковинок простейших животных.

Морские простейшие (корненожки и радиолярии) играют весьма важную роль в образовании морских осадочных горных пород. В течение многих десятков миллионов лет их микроскопически мелкие минеральные скелеты оседали на дно и образовывали минеральные отложения.

Известняки, мел и некоторые другие горные породы в значительной мере состоят из остатков скелетов морских простейших. Известняки

с давних пор имеют огромное практическое значение как строительный материал.

Изучение ископаемых остатков простейших играет большую роль в определении возраста разных слоев земной коры и нахождении нефтеносных слоев.

Простейшие – показатель степени загрязненности пресных водоемов. Каждому виду простейших животных необходимы для существования определенные условия.

Одни простейшие живут только в чистой воде, содержащей много растворенного воздуха и не загрязненной отходами фабрик и заводов; другие приспособлены к жизни в водоемах средней загрязненности. Наконец, есть и такие простейшие, которые могут жить в очень загрязненных, сточных водах. Таким образом, нахождение в водоеме определенного вида простейших дает возможность судить о степени его загрязненности.

Простейшие – возбудители болезней человека и животных. Среди простейших очень многие ведут паразитический образ жизни. Они поселяются в различных органах человека и животных и часто бывают причиной тяжелых заболеваний. К болезням, вызываемым простейшими, относятся, например, малярия и кожный лейшманиоз – хранители и переносчики возбудителей болезней.

Итак, простейшие имеют огромное значение в природе и в жизни человека. Одни из них не только полезны, но и необходимы, другие, напротив, опасны.

### **Использование простейших в биотехнологии**

Простейшие относятся к числу нетрадиционных объектов биотехнологии. До недавнего времени они использовались лишь как компонент активного ила при биологической очистке сточных вод.

Существенная роль в создании и функционировании активного ила принадлежит простейшим. Функции простейших достаточно многообразны; они сами не принимают непосредственного участия в потреблении органических веществ, но регулируют возрастной и видовой состав микроорганизмов в активном иле, поддерживая его на определенном уровне. Поглощая большое количество бактерий, простейшие способствуют выходу бактериальных экзоферментов, концентрирующихся в слизистой оболочке и тем самым принимают участие в деструкции загрязнений.

Показателем качества активного ила является коэффициент протозойности, который отражает соотношение количества клеток простей-

ших микроорганизмов к количеству бактериальных клеток. В высококачественном иле на 1 миллион бактериальных клеток должно приходиться 10–15 клеток простейших. При изменении состава сточной воды может увеличиться численность одного из видов микроорганизмов, но другие культуры все равно остаются в составе биоценоза.

В активных илах встречаются представители четырех классов простейших: саркодовые (*Sarcodina*), жгутиковые инфузории (*Mastigophora*), реснитчатые инфузории (*Ciliata*), сосущие инфузории (*Suctorina*).

Простейших используют для биоиндикации степени органического загрязнения водоемов, так как многие виды жгутиконосцев, инфузорий тонко реагируют на содержание органики в воде. По составу видов простейших можно судить об эвтрофности водоемов, т.е. об их органическом загрязнении.

Простейших также применяют для рекультивации почв. Так, наряду с искусственным заселением обедненных почв почвенными животными вносят культуру почвенных простейших для активизации почвообразования.

Простейшие используют как источник кормового белка, т. к. биомасса простейших содержит до 50 % белка. Его высокая биологическая ценность заключается в том, что он содержит все незаменимые аминокислоты, причем содержание свободных аминокислот на порядок выше, чем в биомассе микроводорослей, бактерий и в мясе. Это свидетельствует о широких возможностях применения свободноживущих простейших в качестве источника кормового белка.

В настоящее время простейшие привлекли внимание исследователей как продуценты биологически активных веществ. В этом качестве рациональнее использовать свободноживущих простейших, обладающих разнообразными биосинтетическими свойствами. Простейшие могут служить потенциальными продуцентами белка и гетерополисахаридов.

В настоящее время налажено производство противоопухолевых препаратов круцина и трепанозы (*Trypanosoma (Schizotrypanum cruzi)*), астазилида (*Astasia longa*), парамилона (*Astasia spp., Euglena spp.*).

Особую экологическую нишу занимают простейшие, обитающие в рубце жвачных животных. Они обладают ферментом целлюлазой, способствующей разложению клетчатки в желудке жвачных. Простейшие рубца могут быть источником этого ценного фермента.

На сегодняшний день имеется опыт разведения паразитических простейших для микробиологической борьбы с вредными насекомыми.

**Использование простейших в качестве корма для личинок рыб.** Для личинок рыб на ранней стадии развития универсальным пер-

вым кормом являются простейшие. Среди простейших наиболее широко используются инфузории, и в первую очередь инфузория туфелька (*Paramecium caudatum* Ehrenberg). Размеры разных видов инфузорий невелики – 50–100 мкм, поэтому их можно увидеть только при большом увеличении микроскопа. У инфузории туфельки размер тела значительно больше, около 200 мкм. Из-за малых размеров инфузории являются доступным кормом для личинок большинства рыб (как промысловых, так и аквариумных). В связи с этим простейшие широко используются в практике лабораторного и промышленного культивирования на ранних стадиях развития рыб. «Закваску» инфузорий несколько капель вносят в емкость из сennого настоя (из расчета 20 г сена на 1 л воды). Культивируют в различных емкостях – колбах, делительных воронках, аппаратах Вейса, бассейнах, полиэтиленовых садках и др. Для постоянного поддержания культуры ее заряжают в нескольких сосудах с интервалом в неделю, при этом каждый сосуд перезаряжают каждые две недели. Для длительного хранения культуры инфузорий, ее хранят в холодильнике при температуре 3–10°C. Температура культивирования 18°C, но пик размножения инфузорий наблюдается при 22–26°C. Для аэрации воды применяют аквариумный компрессор с распылителем воздуха.

При культивировании простейших применяют различные бактериальные, водорослевые и дрожжевые питательные среды. Наиболее часто используется сennый настой, на котором обильно развивается сennая палочка (*Bacillus subtilis*) и другие бактерии, служащие пищей для простейших. Некоторые исследователи в качестве корма при лабораторном культивировании *Paramecium caudatum* использовали сухое молоко, смесь дрожжей и бактерий, экстракт хлореллы, овсяной отвар и др.

Культивирование простейших ведут в накопительном или проточном режимах.

При накопительном культивировании достаточно быстро накапливаются продукты метаболизма, поэтому этот метод используется для получения одноразового небольшого количества простейших. Однако при использовании серии культиваторов (колб или иных сосудов) можно длительное время поддерживать культуру простейших.

Для периодического культивирования широко используется сennый отвар. Берут 10 г сена и помещают его в 1 л воды, кипятят в течение 20 минут, затем фильтруют и разбавляют равным количеством воды (или используют без разбавления).

В настоящее время большое внимание уделяется методам проточного культивирования. В практике непрерывного культивирования микроорганизмов применяют два метода культивирования: пропорционально-проточный и непропорционально-проточный, разработке кото-

рых большое внимание уделяли В. Е. Кокова и Г. М. Лисовский (1976, 1982). Эти методы также могут использоваться при культивировании микроводорослей, коловраток и других организмов.

**Непрерывное пропорционально-проточное культивирование** характеризуется тем, что клетки и культуральная среда в выводимой из культиватора суспензии находятся в том же соотношении, что и в культиваторе. Это достигается установкой в культиваторе различных перемешивающих устройств, обеспечивающих равномерное распределение организмов в суспензии.

**Непрерывное непропорционально-проточное культивирование** характеризуется тем, что соотношение организмов в культиваторе и в выводимой из культиватора суспензии находятся совершенно в ином соотношении. Это связано с тем, что часть клеток простейших осаждаются на стенках культиватора, особенно при использовании пластин, увеличивающих внутреннюю поверхность сосуда.

Для выращивания простейших используются сосуды типа делительных воронок с одним или двумя эрлифтами объемом от 0,2 до 10 литров. Эрлифты служат для аэрации среды, с расходом воздуха 9 л/мин. Кормом служит смесь дрожжей и бактерий. Ежедневно 3–10 раз сливают определенный объем культуры парамеций и добавляют равный объем среды с кормом. Оптимум скорости потока среды составлял 0,6 объема среды в культиваторе, т.е. 60 %. Специалистами были получены высокие показатели продуктивности культуры. Суточная продукция инфузорий стабильно держалась на уровне 2 г сухого или примерно 20 г сырого вещества на 1 л культуры.

В улучшенном варианте культиваторов с двумя эрлифтами и дополнительными поверхностями (с пластинами внутри для увеличения площади прикрепления парамеций) была достигнута максимальная плотность культуры 73 тыс. особей на 1 мл. Полученные величины продукции инфузорий 20 кг/м<sup>3</sup> в сутки намного превышают продукцию других организмов при периодическом культивировании.

Для пропорционально-проточного метода используют реакторы с перемешивающим устройством, обеспечивающим равномерное распределение организмов в среде. Для регулирования подачи среды при непрерывном методе используют специальные дозаторы, которые подают питательную суспензию в реактор и удаляет определенный объем отработанной суспензии вместе с простейшими. Ролики изготовлены из тефлона, шланги – медицинские. Дозатор прикрепляется к мотору с определенным количеством оборотов и работает в заданном режиме. Скорость потока может изменяться за счет диаметра шланга и скорости вращения роликов.

При данном способе культивирования на 10-е сутки популяция *Paramecium caudatum* достигала 14 тысяч экземпляров в 1 мл среды (при исходной численности 1 тыс. экз./мл) и удерживалась на этом уровне в течение одного месяца. Продукция составляла 6 тыс. экз./мл в сутки (или 6 г сырого вещества на 1 литр в сутки).

### Контрольные вопросы:

- 1 В чём состоят отличия в строении одноклеточных эукариот – *Protozoa* от прокариот?
- 2 Каковы способы питания у простейших? Назовите органеллы пищеварения.
- 3 Опишите роль простейших в пищевых цепях экосистем.
- 4 Перечислите типы ядерного аппарата у простейших и способы их деления.
- 5 Как протекает размножение простейших? Расскажите о разнообразии жизненных циклов.
- 6 Назовите признаки плезиоморфности и апоморфности у типов *Protozoa*.
- 7 Проиллюстрируйте примерами использование простейших в биотехнологии.

## ТЕМА 8. ВИРУСЫ, БАКТЕРИОФАГИ, ПЛАЗМИДЫ КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

### Общая характеристика вирусов

Вирусы (от лат. «*virus*» – яд) – наименьшие по размерам агенты, имеющие геном, окруженный белковой оболочкой. Вирусы не воспроизводятся самостоятельно, они – облигатные внутриклеточные паразиты, репродуцирующиеся только в живых клетках. Все вирусы существуют в двух формах. В настоящее время известны вирусы бактерий (бактериофаги), грибов, растений и животных.

Вирусы микроорганизмов называют *фагами*, они имеют соответственное название: бактериофаги – поражающие бактерий; актинофаги – актиномицеты; микофаги – вирусы грибов; цианофаги – паразитов сине-зеленых водорослей или цианобактерий.

При проникновении вирусов в микроорганизмы наблюдается растворение (лизис) последних. Впервые лизис бактерий наблюдал Н. Ф. Гамалея в 1898 г., в 1917 г. Д'Эррель также обнаружил подобное явление.

Внеклеточная форма – вирион – включает в себя все составные элементы (капсид, нуклеиновую кислоту – ДНК или РНК, структурные белки, ферменты и др.).

По химическому составу вирусы неоднородны. Одни из них состоят только из белка и одной из нуклеиновых кислот – ДНК или РНК; другие содержат еще липоиды, полисахариды. Нуклеиновая кислота в виде спирали располагается внутри вируса. Открытие вирусов связано с именем Д. Ивановского и датируется 1892 годом.

Вирусология – наука о вирусах, которая изучает ультрамикробы (вирусы), их природу, морфологию, химический состав, взаимодействие с клеткой макроорганизма, диагностику вирусных болезней и их лечение.

### Морфология вирусов

Вирусы относятся к царству *Vira*. Это мельчайшие микроорганизмы, не имеющие клеточного строения, белоксинтезирующей системы, содержащие только один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК).

Они отличаются особым разобщенным (дисъюнктивным) способом размножения (репродукции): в клетке отдельно синтезируются нуклеиновые кислоты вирусов и их белки и затем происходит их сборка в вирусные частицы. Вирусы, являясь облигатными внутриклеточными па-

разитами, размножаются в цитоплазме или ядре клетки. Сформированная вирусная частица называется *вирионом*.

Форма вирионов может быть различной: палочковидной (вирус табачной мозаики), пулевидной (вирус бешенства), сферической (вирусы полиомиелита, ВИЧ), в виде сперматозоида (многие бактериофаги) (рис. 56).



**Рисунок 56 – Форма вирионов:**

- 1 – палочковидный (вирус табачной мозаики),  
2 – пулевидной (вирус бешенства), 3 – сферический (ВИЧ)

Размеры вирусов определяют с помощью электронной микроскопии, методом ультрафильтрации через фильтры с известным диаметром пор, методом ультрацентрифугирования. Одними из самых мелких вирусов являются вирусы полиомиелита и ящура (около 20 нм), цирковирсы (16 нм), наиболее крупным – вирус натуральной оспы (около 350 нм).

Различают ДНК-содержащие и РНК-содержащие вирусы. Они обычно гаплоидны, то есть имеют один набор генов. Геном вирусов представлен различными видами нуклеиновых кислот: двунитчатыми, однонитчатыми, линейными, кольцевыми, фрагментированными. Среди РНК-содержащих вирусов различают вирусы с положительным (плюс-нить РНК) геномом. Плюс-нить РНК этих вирусов выполняет наследственную функцию и функцию информационной РНК (иРНК). Имеются также РНК-содержащие вирусы с отрицательным (минус-нить РНК) геномом. Минус-нить РНК этих вирусов выполняет только наследственную функцию. Геном вирусов способен включаться в состав генетического аппарата клетки в виде провируса, проявляя себя генетическим паразитом клетки. Нуклеиновые кислоты некоторых вирусов (вирусы герпеса и др.) могут находиться в цитоплазме инфицированных клеток, напоминая плазмиды.

По структуре различают простые (например, вирус полиомиелита) и сложные (например, вирусы гриппа, кори) вирусы.

У простых вирусов нуклеиновая кислота связана с белковой оболочкой, называемой капсидом (от лат. «capsa» – футляр). Капсид состоит из повторяющихся морфологических субъединиц – капсомеров. Нуклеиновая кислота и капсид, взаимодействуя друг с другом, образуют нуклеокапсид.

У сложных вирусов капсид окружен дополнительной липопротеидной оболочкой – суперкапсидом (производное мембранных структур клетки-хозяина), имеющим «шипы» (рис. 57). Капсид и суперкапсид защищают вирионы от влияния окружающей среды, обуславливают избирательное взаимодействие (адсорбцию) с клетками, определяют антигенные и иммуногенные свойства вирионов. Внутренние структуры вирусов называют сердцевиной.

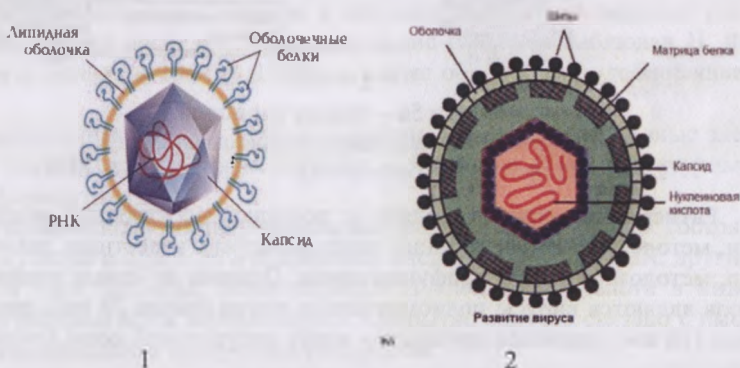


Рисунок 57 – Структура вируса: 1 – простого; 2 – сложного

Для вирионов характерен спиральный, кубический и сложный типы симметрии капсида. Спиральный тип симметрии обусловлен винтообразной структурой нуклеокапсида, кубический – образованием изометрического полого тела из капсида, содержащего вирусную нуклеиновую кислоту.

### Размножение вирусов

**Взаимодействие вируса с клеткой.** Известны три типа взаимодействия вируса с клеткой:

1) продуктивный тип, завершающийся образованием вирусного потомства;

2) абортивный тип, не завершающийся образованием новых вирусных частиц, поскольку инфекционный процесс прерывается на одном из этапов;

3) интегративный тип, или вирогенез, характеризующийся встраиванием вирусной ДНК в хромосому клетки-хозяина.

Продуктивный тип взаимодействия (репродукция вирусов). Репродукция вирусов (от англ. «reproduce» – воспроизводить) осуществляется в несколько стадий, последовательно сменяющих друг друга:

- адсорбция вируса на клетке;
- проникновение вируса в клетку;
- «раздевание» вируса;
- биосинтез вирусных компонентов в клетке;
- формирование вирусов;
- выход вирусов из клетки.

**Адсорбция.** Взаимодействие вируса с клеткой начинается с процесса адсорбции, то есть прикрепления вирусов к поверхности клетки. Это высокоспецифический процесс. Вирус адсорбируется на определенных участках клеточной мембраны – так называемых рецепторах. Клеточные рецепторы могут иметь разную химическую природу, представляя собой белки, углеводные компоненты белков и липидов, липиды. Количество специфических рецепторов на поверхности одной клетки колеблется от  $10^4$  до  $10^5$ . Следовательно, на клетке могут адсорбироваться десятки и даже сотни вирусных частиц. Поверхностные структуры вируса, «узнающие» специфические клеточные рецепторы и взаимодействующие с ними, называются прикрепительными белками. Обычно эту функцию выполняет один из поверхностных белков капсида или суперкапсида. Соответствие (комплементарность) клеточных рецепторов вирусным прикрепительным белкам имеет значение для возникновения инфекционного процесса в клетке. Способность вирусов избирательно поражать определенные клетки органов и тканей организма называют *тропизмом вирусов* (от греч. «tropos» – направление).

**Проникновение вируса в клетку.** Существует два способа проникновения вирусов животных в клетку: виropексис и слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной. При виropексисе после адсорбции вирусов происходят инвагинация (впячивание) участка клеточной мембраны и образование внутриклеточной вакуоли, которая содержит вирусную частицу. Вакуоль с вирусом может транспортироваться в любом направлении в разные участки цитоплазмы или ядро клетки. Процесс слияния осуществляется одним из поверхностных вирусных белков капсидной или суперкапсидной оболочки. По-видимому, оба механизма проникновения вируса в клетку не исключают, а дополняют друг друга.

**«Раздевание» вируса.** Процесс «раздевания» заключается в удалении защитных вирусных оболочек и освобождении внутреннего компонента вируса, способного вызвать инфекционный процесс. «Раздевание» вирусов происходит постепенно, в несколько этапов, в определенных участках цитоплазмы или ядра клетки, для чего клетка использует набор специальных ферментов. В случае проникновения вируса путем слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной процесс проникновения вируса в клетку сочетается с первым этапом его «раздевания». Конечными продуктами «раздевания» являются нуклеокапсид или нуклеиновая кислота вируса.

**Биосинтез компонентов вируса в клетке.** Проникшая в клетку вирусная нуклеиновая кислота несет генетическую информацию, которая успешно конкурирует с генетической информацией клетки. Она дезорганизует работу клеточных систем, подавляет собственный метаболизм клетки и заставляет ее синтезировать новые вирусные белки и нуклеиновые кислоты, идущие на построение вирусного потомства. Реализация генетической информации вируса осуществляется в соответствии с хорошо известными из биологии процессами транскрипции. Поскольку генетический аппарат вирусов достаточно разнообразен, то передача наследственной информации в отношении синтеза иРНК различна.

Основные схемы реализации вирусной генетической информации могут быть представлены следующим образом:

– для ДНК-содержащих вирусов: ДНК вируса → иРНК → белок вируса;

– для РНК-содержащих минус-нитевых вирусов: РНК вируса → иРНК → белок вируса;

– для РНК-содержащих плюс-нитевых вирусов: РНК вируса → белок вируса;

– для РНК-содержащих ретровирусов: РНК вируса → комплементарная ДНК → иРНК → белок вируса.

Для синтеза и РНК одни вирусы используют клеточные ферменты, другие – собственный набор ферментов (полимераз). Вирусная нуклеиновая кислота кодирует синтез двух классов белков: неструктурных белков – ферментов, которые обслуживают процесс репродукции вирусов на разных его этапах, и структурных белков, которые войдут в состав вирусных частиц потомства. Синтез компонентов вируса (белков и нуклеиновых кислот) разобщен во времени и пространстве, то есть протекает в разных структурах ядра и цитоплазмы клетки. Вот почему этот уникальный способ размножения вирусов называется дисъюнктивным (от лат. *«disjunctus»* – разобщенный).

**Формирование (сборка) вирусов.** Синтезированные вирусные нуклеиновые кислоты и белки обладают способностью специфически «узнавать» друг друга и при достаточной их концентрации самопроизвольно соединяются в результате гидрофобных, солевых и водородных связей.

Существуют следующие общие принципы сборки вирусов, имеющих разную структуру:

- формирование вирусов является многоступенчатым процессом с образованием промежуточных форм;

- сборка просто устроенных вирусов заключается во взаимодействии молекул вирусных нуклеиновых кислот с капсидными белками и образовании нуклеокапсидов (например, вирусы полиомиелита).

У сложно устроенных вирусов сначала формируются нуклеокапсиды, с которыми взаимодействуют белки суперкапсидных оболочек (например, вирусы гриппа);

- формирование вирусов происходит не во внутриклеточной жидкости, а на ядерных или цитоплазматических мембранах клетки;

- сложно организованные вирусы в процессе формирования включают в свой состав компоненты клетки-хозяина (липиды, углеводы).

**Выход вирусов из клетки.** Различают два основных типа выхода вирусного потомства из клетки.

Первый тип – взрывной – характеризуется одновременным выходом большого количества вирусов. При этом клетка быстро погибает. Такой способ выхода характерен для вирусов, не имеющих суперкапсидной оболочки.

Второй тип – почкование. Он присущ вирусам, имеющим суперкапсидную оболочку. На заключительном этапе сборки нуклеокапсиды сложно устроенных вирусов фиксируются на клеточной плазматической мембране, модифицированной вирусными белками, и постепенно выпячивают ее. В результате выпячивания образуется «почка», содержащая нуклеокапсид. Затем «почка» отделяется от клетки.

Таким образом, внешняя оболочка этих вирусов формируется в процессе их выхода из клетки. При таком механизме клетка может продолжительное время продуцировать вирус, сохраняя в той или иной мере свои основные функции. Время, необходимое для осуществления полного цикла репродукции вирусов, варьирует от 5–6 ч (вирусы гриппа, натуральной оспы и др.) до нескольких суток (вирусы кори, аденовирусы и др.). Образовавшиеся вирусы способны инициировать новые клетки и проходить в них указанный выше цикл репродукции. Интегративный тип взаимодействия (виrogenения). Характеризуется встраиванием (интеграцией) нуклеиновой кислоты вируса в хромосому клетки. При

этом вирусный геном реплицируется и функционирует как составная часть клеточного генома. Интеграция вирусного генетического материала с ДНК клетки характерна для определенных групп вирусов: бактериофагов, онкогенных вирусов, некоторых инфекционных вирусов (вирус гепатита В, аденовирус, ВИЧ). Для интеграции с хромосомой клетки необходима кольцевая форма двуничей вирусной ДНК. У ДНК-содержащих вирусов (вирус гепатита В) их ДНК обладает свойством встраиваться в геном клетки при участии ряда ферментов.

У некоторых РНК-содержащих вирусов (ВИЧ, онкогенные вирусы) процесс интеграции более сложный и является обязательным в цикле их репродукции. У этих вирусов сначала на матрице РНК с помощью вирусспецифического фермента обратной транскриптазы (ревертазы) синтезируется ДНК-копия, которая затем встраивается в ДНК клетки. ДНК вируса, находящаяся в составе хромосомы клетки, называется ДНК-провирсом. При делении клетки, сохраняющей свои нормальные функции, ДНК-провирус переходит в геном дочерних клеток, то есть состояние вирогении наследуется. ДНК-провирус несет дополнительную генетическую информацию, в результате чего клетки приобретают ряд новых свойств.

Так, интеграция может явиться причиной возникновения ряда аутоиммунных и хронических заболеваний, разнообразных опухолей. Под воздействием ряда физических и химических факторов ДНК-провирус может исключаться из клеточной хромосомы и переходить в автономное состояние, что ведет к репродукции вируса.

### **Культивирование и индикация вирусов**

Культивирование вирусов человека и животных проводят с целью лабораторной диагностики вирусных инфекций, для изучения вопросов патогенеза и иммунитета, получения диагностических и вакцинных препаратов, применяют в научно-исследовательской работе. Поскольку вирусы являются абсолютными паразитами, их культивируют или на уровне организма, или на уровне живых клеток, выращиваемых вне организма в искусственных условиях.

В качестве биологических моделей для культивирования используют лабораторных животных, развивающиеся куриные эмбрионы и культуры клеток. Лабораторные животные (белые мыши, хлопковые крысы, кролики, хомяки, обезьяны и др.) в начальный период развития вирусологии были единственной экспериментальной биологической моделью, которую использовали для размножения и изучения свойств вирусов. На основании развития типичных признаков заболевания и патоморфоло-

гических изменений органов животных можно судить о репродукции вирусов, то есть проводить индикацию вирусов. В настоящее время применение этой модели для диагностики ограничено из-за невосприимчивости животных ко многим вирусам человека.

Куриные эмбрионы предложены в качестве экспериментальной модели для культивирования вирусов в середине 30-х гг. прошлого века Ф. Бернетом. К достоинствам модели относятся возможность накопления вирусов в больших количествах, стерильность объекта, отсутствие скрытых вирусных инфекций, простота техники работы. Для культивирования вирусов исследуемый материал вводят в различные полости и ткани куриного зародыша.

Индикацию вирусов осуществляют по характеру специфических поражений оболочек и тела эмбриона, а также феномену гемагглютинации – склеиванию эритроцитов. Явление гемагглютинации впервые было обнаружено в 1941 г. при культивировании в куриных эмбрионах вирусов гриппа. Позднее было установлено, что гемагглютинирующими свойствами обладают многие вирусы.

На основе этого феномена была разработана техника реакции гемагглютинации (РГА) вне организма (*in vitro*), которая широко применяется для лабораторной диагностики вирусных инфекций. Куриные эмбрионы не являются универсальной биологической моделью для вирусов. Почти неограниченные возможности появились у вирусологов после открытия метода выращивания культур клеток.

Метод культур клеток – выращивание различных клеток и тканей вне организма на искусственных питательных средах – разработан в 1950-х гг. Дж. Эндерсом с сотрудниками. Подавляющее большинство вирусов способно размножаться на культурах клеток.

Для приготовления таких культур используют самые разнообразные ткани человека, животных и птиц. Большое распространение получили культуры клеток из эмбриональных и опухолевых (злокачественно перерожденных) тканей, обладающих по сравнению с нормальной тканью взрослого организма более активной способностью к росту и размножению.

В зависимости от техники приготовления и культивирования различают три типа культур клеток и тканей: однослойные культуры клеток; культуры суспензированных клеток; органннe культуры.

Наибольшее практическое применение получили однослойные культуры, растущие на поверхности стекла лабораторной посуды в виде монослоя клеток. Однослойные культуры клеток в зависимости от числа жизнеспособных генераций, в свою очередь, подразделяются на первичные, или первично-трипсинизированные (способны размножаться одно-

кратно), перевиваемые, или стабильные (способны перевиваться в лабораторных условиях в течение неопределенно длительного срока), и полуперевиваемые (способны размножаться в течение 40–50 пассажей).

Культуры суспензированных клеток растут и размножаются во взвешенном состоянии при постоянном интенсивном перемешивании среды. Они могут быть использованы для накопления большого количества вирусов. Некоторые вирусы лучше размножаются в органных культурах, которые представляют собой кусочки органов животного и человека, выращиваемых вне организма и сохраняющих свойственную данному органу структуру. В зависимости от свойств вируса подбирают наиболее чувствительную к данному вирусу культуру клеток, на которой возможна его репродукция.

О размножении вирусов в культуре клеток свидетельствуют следующие признаки:

- цитопатический эффект;
- образование в клетках включений;
- образование бляшек;
- феномен гемадсорбции;
- «цветная» реакция.

Цитопатический эффект (ЦПЭ или ЦПД) – видимые под микроскопом морфологические изменения клеток вплоть до их гибели, возникающие в результате повреждающего действия вирусов. Характер ЦПЭ, вызванного разными вирусами, неодинаков. Включения представляют собой скопления вирусных белков или клеточного материала, которые можно обнаружить в ядре или цитоплазме клеток при специальных методах окраски. Бляшки, или «негативные колонии» вирусов, участки разрушенных вирусами клеток; их можно обнаружить при культивировании вирусов на однослойных клеточных культурах, покрытых тонким слоем агара. Бляшки, образуемые разными вирусами, отличаются по величине, форме, времени появления, поэтому реакция бляшкообразования используют для дифференциации вирусов.

Феномен гемадсорбции – способность клеточных культур, зараженных вирусом, адсорбировать на своей поверхности эритроциты. Механизмы реакций гемадсорбции и гемагглютинации сходны. Многие вирусы обладают гемадсорбирующими свойствами.

«Цветная» реакция основана на разнице в цвете индикатора питательной среды, используемой для культур клеток. При росте клеток, не пораженных вирусом, накапливаются продукты метаболизма, что приводит к изменению цвета индикатора питательной среды. При репро-

дукции вирусов в культуре нарушается нормальный метаболизм клеток и среда сохраняет первоначальный цвет.

### **Бактериофаги**

Бактериофаги – вирусы бактерий, обладающие способностью специфически проникать в бактериальные клетки, репродуцироваться в них и вызывать их растворение (лизис).

История открытия бактериофагов связана с именем канадского исследователя Ф. д'Эрелля (1917 г.), который обнаружил эффект лизиса бактерий, выделенных из испражнений больного дизентерией. Такие явления наблюдали и другие микробиологи (Н. Ф. Гамалея, 1898 г.; Ф. Турорт, 1915 г.), но лишь Ф. д'Эрелль, предположив, что имеет дело с вирусом, выделил этот «литический фактор» с помощью бактериальных фильтров и назвал его бактериофагом. В дальнейшем выяснилось, что бактериофаги широко распространены в природе. Их обнаружили в воде, почве, пищевых продуктах, различных выделениях организмов людей и животных, то есть там, где встречаются бактерии. В настоящее время эти вирусы выявлены у большинства бактерий как болезнетворных, так и неболезнетворных, а также ряда других микроорганизмов (например, грибов). Поэтому в широком смысле слова их стали называть просто фагами. Фаги различаются по форме, структурной организации, типу нуклеиновой кислоты и характеру взаимодействия с микробной клеткой.

Явление бактериофагии иногда наблюдается на производствах, использующих микроорганизмы; при этом технологический процесс резко нарушается, что приносит вред качеству продукции.

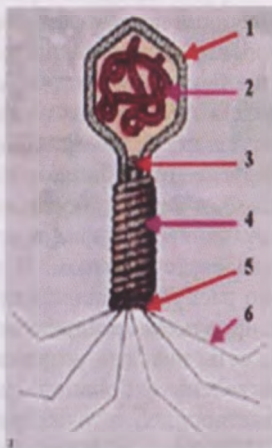
Фаги широко распространены в природе, обладают специфичностью, т.е. поражают определенный вид или группу близких видов микроорганизмов.

Некоторые фаги применяют в медицине для профилактики или лечения заболеваний; используют как модель в молекулярной биологии, биохимии, генетике и других науках.

### **Морфология**

Большинство фагов под электронным микроскопом имеют форму головастика или сперматозоида, некоторые – кубическую или нитевидную формы. Размеры фагов колеблются от 20 до 800 нм у нитевидных фагов.

**Химический состав.** Фаги состоят из двух основных химических компонентов – нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и белка. У фагов, имеющих форму сперматозоида, двунитчатая ДНК плотно упакована в виде спирали внутри головки. Белки входят в состав оболочки (капсида), окружающей нуклеиновую кислоту, и во все структурные элементы хвостового отростка (рис. 58).



**Рисунок 58** – Схематичное строение Т-фага кишечной палочки со смешанным типом симметрии:

- 1 – кубовидная капсидная головка, 2 – двунитчатая ДНК,
- 3 – стержень, 4 – спиралеобразный сокращающийся капсид (чехол),
- 5 – базальная пластинка, 6 – хвостовые фибриллы.

Структурные белки фага различаются по составу полипептидов и представлены в виде множества идентичных субъединиц, уложенных по спиральному или кубическому типу симметрии. Кроме структурных белков, у некоторых фагов обнаружены внутренние (геномные) белки, связанные с нуклеиновой кислотой, и белки-ферменты (лизоцим, АТФ-аза), участвующие во взаимодействии фага с клеткой.

**Резистентность.** Фаги более устойчивы к действию химических и физических факторов, чем бактерии. Ряд дезинфицирующих веществ (фенол, этиловый спирт, эфир и хлороформ) не оказывают существенного влияния на фаги. Высокочувствительны фаги к формалину и кислотам. Инактивация большинства фагов наступает при температуре 65–70°C. Длительное время они сохраняются при высушивании в запаянных ампулах, замораживании при температуре -185°C в глицерине.

## Взаимодействие фага с бактериальной клеткой

По механизму взаимодействия различают вирулентные и умеренные фаги. Вирулентные фаги, проникнув в бактериальную клетку, автономно репродуцируются в ней и вызывают лизис бактерий. Процесс взаимодействия вирулентного фага с бактерией протекает в несколько стадий и похож на процесс взаимодействия вирусов человека и животных с клеткой хозяина. Однако у фагов, имеющих хвостовой отросток с сокращающимся чехлом, он имеет особенности. Эти фаги адсорбируются на поверхности бактериальной клетки с помощью фибрилл хвостового отростка. В результате активации фагового фермента АТФазы происходит сокращение чехла хвостового отростка и внедрение стержня в клетку. В процессе «прокальвания» клеточной стенки бактерии принимает участие фермент лизоцим, находящийся на конце хвостового отростка. Вслед за этим ДНК фага, содержащаяся в головке, проходит через полость хвостового стержня и активно впрыскивается в цитоплазму клетки. Остальные структурные элементы фага (капсид и отросток) остаются вне клетки (рис. 59).

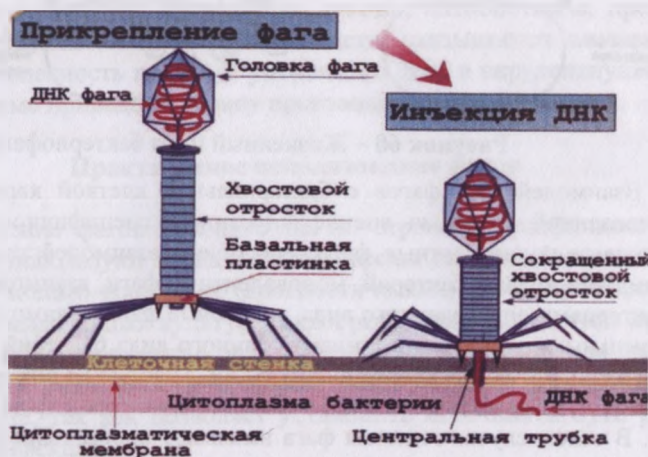


Рисунок 59 – Взаимодействие бактериофага с клеточной стенкой бактерии

После биосинтеза фаговых компонентов и их самосборки в бактериальной клетке накапливается до 200 новых фаговых частиц. Под действием фагового лизоцима и внутриклеточного осмотического

давления происходит разрушение клеточной стенки, выход фагового потомства в окружающую среду и лизис бактерии. Один литический цикл (от момента адсорбции фагов до их выхода из клетки) продолжается 30–40 мин. Процесс бактериофагии проходит несколько циклов, пока не будут лизированы все чувствительные к данному фагу бактерии (рис. 60).



Рисунок 60 – Жизненный цикл бактериофага

Взаимодействие фагов с бактериальной клеткой характеризуется определенной степенью специфичности. По специфичности действия различают поливалентные фаги, способные взаимодействовать с родственными видами бактерий, моновалентные фаги, взаимодействующие с бактериями определенного вида, и типовые фаги, взаимодействующие с отдельными вариантами (типами) данного вида бактерий. Умеренные фаги лизируют не все клетки в популяции, с частью из них они вступают в симбиоз, в результате чего ДНК фага встраивается в хромосому бактерии. В таком случае геномом фага называют профаг. Профаг, ставший частью хромосомы клетки, при ее размножении реплицируется синхронно с геномом бактерии, не вызывая ее лизиса, и передается по наследству от клетки к клетке неограниченному числу потомков.

Биологическое явление симбиоза микробной клетки с умеренным фагом (профагом) называется лизогенией, а культура бактерий, содержащая профаг, получила название лизогенной. Это название (от греч. «*lysis*» – разложение, «*genea*» – происхождение) отражает способность профага самопроизвольно или под действием ряда физических и хими-

ческих факторов исключаться из хромосомы клетки и переходить в цитоплазму, то есть вести себя как вирулентный фаг, лизирующий бактерии. Лизогенные культуры по своим основным свойствам не отличаются от исходных, но они невосприимчивы к повторному заражению гомологичным или близкородственным фагом и, кроме того, приобретают дополнительные свойства, которые находятся под контролем генов профага.

Изменение свойств микроорганизмов под влиянием профага получило название фаговой конверсии. Последняя имеет место у многих видов микроорганизмов и касается различных их свойств: культуральных, биохимических, токсигенных, антигенных, чувствительности к антибиотикам и др. Кроме того, переходя из интегрированного состояния в вирулентную форму, умеренный фаг может захватить часть хромосомы клетки и при лизисе последней переносит эту часть хромосомы в другую клетку. Если микробная клетка станет лизогенной, она приобретет новые свойства.

Таким образом, умеренные фаги являются мощным фактором изменчивости микроорганизмов. Умеренные фаги могут нанести вред микробиологическому производству. Так, если микроорганизмы, используемые в качестве продуцентов вакцин, антибиотиков, продуктов питания и других биологических веществ, оказываются лизогенными, существует опасность перехода умеренного фага в вирулентную форму, что неминуемо приведет к лизису производственного штамма.

### **Практическое использование фагов**

Применение фагов основано на их строгой специфичности действия. Фаги используют в диагностике инфекционных заболеваний:

– с помощью известных (диагностических) фагов проводят идентификацию выделенных культур микроорганизмов. Вследствие высокой специфичности фагов можно определить вид возбудителя или варианты (типы) внутри вида. Фаготипирование имеет большое эпидемиологическое значение, так как позволяет установить источник и пути распространения инфекции;

– с помощью тест-культуры можно определить неизвестный фаг в исследуемом материале, что указывает на присутствие в нем соответствующих возбудителей.

Фаги применяют для лечения и профилактики инфекционных болезней. Производят брюшнотифозный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый фаги и комбинированные препараты.

Умеренные фаги используют в генетической инженерии и биотехнологии в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК:

– Фаг  $\lambda$  – умеренный колифаг с длинным несократительным хвостовым отростком и двунитевым ДНК геномом размером 48 502 п. н. Центральная часть генома фага не существенна для его функционирования и используется для заместительной вставки клонируемой ДНК по единственному сайту узнавания для рестриктазы EcoRI. Сам по себе этот вектор короток для упаковки в головку фага (размеры головки накладывают ограничение не только на максимальную, но и на минимальную длину генома). Таким образом, чтобы получить фаг, способный размножаться с образованием зрелых фаговых частиц, в разрезанный родительский вектор должен быть непременно встроено фрагмент чужеродной ДНК. Это приводит к образованию автоматической селективной системы для отбора химерных фаговых геномов.

– Фаг M13 – нитевидный колифаг, имеющий кольцевой однонитевой ДНК-геном. Для получения рекомбинантных ДНК используют репликативную форму фага, представляющую собой кольцевую двухнитевую ДНК размером 6400 п.н., в которую вставлен ген *lacZ*, содержащий полилинкер сайтов для целого ряда рестриктаз. Использование векторов на основе фага M13 имеет ряд положительных моментов. Так, одно клонирование дает два вида фагов с однонитевым ДНК-геномом. Каждый вид фага содержит только одну из нитей вставки ДНК, которые могут находиться в разных ориентациях. В связи с этим, клонирование с использованием фага M13 удобно для создания однонитевых ДНК-зондов и секвенирования ДНК.

Попытка объединить преимущества плазмидных и фаговых векторов привела к созданию космид. Это плазмиды со встроенными специфическими последовательностями ДНК (*cos*-сайтами), отвечающими за упаковку ДНК фага  $\lambda$  в фаговой частице. Такие векторы могут существовать в бактерии в виде плазмид, но могут быть выделены в чистом виде путем их упаковки в фаговые частицы *in vitro*. Ценность космидных векторов заключается в их большой емкости – то есть в возможности клонирования вставок большого размера.

### Плазмиды

**Особенности организации плазмид.** Плазмиды обнаружены у многих бактерий, принадлежащих к разным таксономическим группам. Для них характерно стабильное существование в нехромосомном состоянии. Количество плазмидной ДНК в клетке составляет обычно не более нескольких процентов от клеточного генома, а число плазмид колеблется от 1 до 38.

Плазмиды – это линейные или кольцевые ковалентно замкнутые молекулы ДНК, содержащие от 1500 до 90000 пар нуклеотидов. Большинство плазмид состоит из трех групп генов: участка ДНК, ответственного за автономную репликацию плазмиды в клетке; системы генов, обеспечивающих возможность переноса плазмид из одной клетки в другую; генов, определяющих свойства, полезные для клетки-хозяина.

Отличительная особенность плазмид – способность к автономной репликации. Обычно о присутствии плазмид в бактериальной клетке судят по проявлению определенных признаков, к которым относятся устойчивость к отдельным лекарственным препаратам, способность к переносу генов при конъюгации, синтез веществ антибиотической природы, способность использовать некоторые сахара или обеспечивать деградацию ряда веществ.

Впервые обнаруженные у *E.coli* генетические элементы, которые передавались у нее по наследству во внехромосомном состоянии, получили название просто генетических факторов. Раньше всего были обнаружены Col-фактор (фактор, контролирующий у *E.coli* синтез бактерицидных белков, А. Грациа, 1925 г.) и F-фактор (фактор, контролирующей примитивный половой процесс у бактерий – конъюгацию, У. Хэйс, 1953 г.). Интерес к этим факторам сильно возрос после того, как в 1963 г. японский ученый Т. Ватанабе сообщил, что передача множественной лекарственной устойчивости у дизентерийных бактерий происходит также при участии независимых от хромосомы генетических элементов, названных R-факторами (от англ. resistance – устойчивость).

В 1976 г. всем подобного рода генетическим элементам было дано название плазмид и следующее определение: «Плаزمид (внехромосомный генетический элемент) представляет собой репликон, который стабильно наследуется во внехромосомном состоянии». Однако это определение оставляет открытыми вопросы о том, являются ли плазмиды организмами или нет, и о месте плазмид в живой природе. Поскольку плазмиды имеют собственные гены, которые наделяют их специфическими наследственными признаками и способностью к размножению, они должны быть, несомненно, отнесены к живым организмам.

Плазмиды обладают большим сходством с вирусами, поэтому их следует объединить с ними в одно царство в качестве самостоятельного класса. С вирусами их объединяют следующие общие фундаментальные признаки:

- 1) подобно вирусам, плазмиды не имеют собственной белоксинтезирующей системы;
- 2) как и у вирусов, у них нет собственной системы мобилизации энергии;
- 3) плазмиды, как и вирусы, не способны к росту и бинарному делению, они размножаются путем саморепликации его;

4) плазмиды, подобно вирусам, являются абсолютными внутриклеточными паразитами. Вместе с тем плазмиды существенным образом отличаются от вирусов, и поэтому они должны рассматриваться как самостоятельная, обособленная от вирусов группа организмов.

Главные отличия плазмид от вирусов следующие:

1. Геном плазмид представлен только двунитовой ДНК, у вирусов же имеется более 10 вариантов РНК- и ДНК-геномов. Правда, у некоторых грамположительных бактерий плазмиды существуют не только в виде двунитовых молекул ДНК, но и в виде одонитевых. Однако каждая из них соответствует одной из двух нитей плазмидной ДНК (на долю таких одно нитевых молекул приходится не более 1/3 общего количества копий плазмиды), и в результате репликации, происходящей по типу «крутящегося кольца», одонитевая молекула превращается в двунитовую молекулу плазмидной ДНК.

2. Плазмиды в отличие от вирусов и других микроорганизмов вообще не имеют никакой оболочки. Они представляют собой «голые» геномы. Это их главная биологическая особенность.

3. В связи с отсутствием белковой оболочки размножение плазмид происходит только путем саморепликации их ДНК и не требует синтеза структурных белков и процессов самосборки.

4. Средой обитания вирусов являются клетки бактерий, растений и животных. Средой обитания плазмид – только бактерии.

5. В отличие от вирусов плазмиды обладают системами генов, которые наделяют их способностью к самопереносу или к мобилизации на перенос от клетки к клетке.

6. Плазмиды и вирусы отличаются друг от друга и по тем последствиям, к которым приводит инфицирование ими клеток.

Заражение вирусами в большинстве случаев приводит к подавлению функционирования клеточного генома. Вирулентный вирус размножается в клетке и вызывает ее гибель или нарушает нормальное функционирование (при персистенции). Только умеренные фаги при лизогенизации бактерий наделяют их дополнительными свойствами. В отличие от вирусов плазмиды, проникая в бактериальную клетку, не размножаются в ней бесконтрольно и не подавляют функции бактериальной хромосомы, а сосуществуют с ней и сами контролируют образование числа возможных своих копий на хромосому клетки. Плазмиды не только не вызывают гибели клеток, которые являются для них естественной средой обитания, а наоборот, очень часто наделяют их важными дополнительными (селективными) свойствами. Это основное принципиально важное биологическое различие между плазмидами и вирусами. У вирусов клетка ценой собственной жизни способствует размножению вирусом. Плазмиды, наоборот, своим присутствием обеспечивают размноже-

ние бактерий в неблагоприятных для них условиях (например, в присутствии химиопрепаратов) и, спасая от гибели бактерии, обеспечивают собственное существование. По уровню молекулярно-генетической организации плазмиды занимают еще более низкое, по сравнению с вирусами, место в иерархии живой материи.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что плазмиды – наипростейшие организмы, лишенные оболочки, собственных систем синтеза белка и мобилизации энергии и представляющие собой особый класс абсолютных внутриклеточных паразитов, наделяющих своих бактерий-хозяев полезными для них свойствами. В соответствии с теми свойствами, которыми плазмиды наделяют своих носителей, их подразделяют на различные категории (табл. 5).

**Таблица 5 – Классификация плазмид по свойствам, которыми они наделяют своих носителей**

<b>Категория</b>	<b>Свойства</b>
F-плазмиды	Донорные функции
R-плазмиды	Устойчивость к лекарственным препаратам
Col-плазмиды	Синтез колицинов
Ent-плазмиды	Синтез энтеротоксинов
Hly-плазмиды	Синтез гемолизина
Биодеградативные плазмиды	Разрушение различных органических и неорганических соединений, в том числе содержащих тяжелые металлы
Криптические плазмиды	Функции неизвестны

У бактерий очень часто обнаруживают криптические плазмиды, то есть плазмиды, функции которых еще не установлены. Поэтому классификация их, несомненно, будет уточняться. Уже сейчас известны плазмиды, контролируемые различными факторами патогенности бактерий (факторы адгезии, инвазии и т. п.).

Существуют два основных способа определения плазмид у бактерий:

- 1) биологический – по тем дополнительным признакам, которыми они наделяют своего хозяина;
- 2) биофизический – по выявлению плазмидных ДНК.

Для изучения биологии плазмид и их молекулярно-генетической организации широко используют различные генетические методы, методы 133 клонирования, выделения чистых плазмидных ДНК, определения

их молекулярных масс, составление рестриктограмм путем разрезания различными эндонуклеазами и определения размеров получаемых фрагментов, а также секвенирования. Сами по себе плазмиды, благодаря их относительно малым размерам и способности к саморепликации, очень часто используются в качестве векторов для клонирования самых различных генов и их последующего изучения.

Большинство плазмид представляют собой кольцевидные суперспирализованные молекулы двунитевой ДНК, размеры которых варьируют от 1500 до 400000 пар нуклеотидов. Кроме того, в ДНК плазмид могут быть гены, которые наделяют клетку-хозяина многими другими свойствами. Очень часто эти гены интегрируются в плазмидную ДНК в виде транспозонов, поэтому молекулярно-генетическая организация плазмид, особенно высокомолекулярных, очень сложна.

Для плазмид как живых существ характерны следующие свойства, частью присущие только им и контролируемые их специфическими генами.

1. Саморегулируемая репликация. Эта функция свойственна всем живым организмам. В составе плазмидных ДНК имеются фиксированная точка *ori* (точка начала репликации) и соответствующие гены, контролирующие репликацию. Репликация мелких плазмид требует, очевидно, дополнительного участия генов клетки-хозяина.

2. Явление поверхностного исключения. Этот механизм не позволяет проникнуть в клетку, уже содержащую плазмиду, другой родственной ей плазмиде. Поверхностное исключение обеспечивается синтезом контролируемых генами плазмиды особых белков наружной мембраны, которые препятствуют установлению контакта этой клетки с клеткой, несущей такую же плазмиду, или подавляют конъюгативный метаболизм ДНК этой плазмиды.

3. Явление несовместимости. Суть его заключается в том, что две близкородственные плазмиды не могут стабильно сосуществовать в одной клетке, одна из них подвергается элиминации (удалению).

4. Контроль числа копий плазмиды на хромосому клетки. Различают малокопийные (1–4 копии) и многокопийные плазмиды (12–38 копий, например у плазмиды R6K). Наличие собственных генов репликации позволяет плазмиде осуществлять репликацию независимо от хромосомной репликации или клеточного цикла клетки-хозяина.

5. Контроль стабильного сохранения плазмид в клетке-хозяине (контроль стабильного поддержания).

6. Контроль равномерного распределения дочерних плазмид в дочерние бактериальные клетки.

7. Способность к самопереносу (у конъюгативных плазмид).

8. Способность к мобилизации на перенос (у неконъюгативных плазмид).

9. Способность наделять клетку-хозяина дополнительными важными для него биологическими свойствами, способствующими выживанию бактерий, а следовательно, и плазмид в природе. Жизненный цикл плазмид складывается из двух главных процессов: вегетативной (или конъюгативной) репликации и равномерного распределения между дочерними клетками. Оба эти процесса относительно независимы друг от друга и контролируются специфическими системами плазмид. Однако вегетативная репликация плазмид и распределение их между дочерними клетками скоординированы с клеточным делением так, что дочерняя клетка стабильно получает необходимое число копий данной плазмиды.

**Распространение плазмид.** Плазмиды распространяются среди бактерий двумя способами: путем передачи от родительской клетки дочерним клеткам в процессе клеточного деления, то есть по вертикали, и путем переноса между клетками в популяции бактерий независимо от клеточного деления, то есть по горизонтали.

Существует несколько генетических механизмов переноса плазмид между бактериальными клетками:

- а) путем трансформации;
- б) с помощью трансдуцирующих фагов;
- в) путем мобилизации на перенос с помощью конъюгативных плазмид;
- г) с помощью самопереноса, осуществляемого *tra*-опероном.

В зависимости от наличия или отсутствия этого оперона плазмиды делятся на конъюгативные и неконъюгативные. Основную роль в широком распространении плазмид играет механизм конъюгационной передачи.

### **Контрольные вопросы:**

- 1 Назовите формы существования вирусов?
- 2 Опишите строение вирусов.
- 3 Охарактеризуйте основные этапы во взаимодействии вируса с клеткой хозяина.
- 4 Какие существуют методы культивирования вирусов?
- 5 Перечислите основные этапы взаимодействия фагов и бактерий.
- 6 В чём заключается практическое использование бактериофагов?
- 7 Охарактеризуйте плазмиды и сферы, в которых они используются.
- 8 Назовите области использования вирусов, бактериофагов и плазмиды в биотехнологии.

## ТЕМА 9. ФЕРМЕНТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ

### Основные сведения о ферментах

Ферменты (от лат. «*fermentum*» – закваска) или энзимы – белковые молекулы или молекулы РНК (рибозимы) или их комплексы, катализирующие химические реакции в живых системах. Наука о ферментах называется энзимологией.

Происхождение терминов связано с тем, что первоначально ферментативные процессы были открыты и изучены в бродильном производстве. Термины «фермент» и «энзим» давно используют как синонимы (первый, в основном, в русской и немецкой научной литературе, второй – в англоязычной). А более ста лет назад эти термины отражали различные точки зрения в теоретическом споре Л. Пастера и Ю. Либиха о природе спиртового брожения.

Ферментами называли «организованные ферменты» (т. е. сами живые микроорганизмы), а термин «энзим» был предложен в 1876 г. В. Кюне для «неорганизованных ферментов», секретруемых клетками желудка или кишечника. Через два года после смерти Л. Пастера (1897 г.) Э. Бюхнер опубликовал работу «Спиртовое брожение без дрожжевых клеток», в которой экспериментально показал, что бесклеточный дрожжевой сок осуществляет спиртовое брожение так же, как и неразрушенные дрожжевые клетки. В 1907 г. за эту работу он был удостоен Нобелевской премии.

В каждой клетке имеются сотни различных ферментов. С их помощью осуществляются многие химические реакции, которые идут с большой скоростью при температурах, подходящих для данного организма, то есть в пределах от 5 до 40°C. Чтобы эти реакции с той же скоростью протекали вне организма, часто требуется высокая температура и резкие изменения некоторых других условий – давления, pH и пр. Для клетки это означало бы гибель, так как вся работа клетки строится таким образом, чтобы сохранялся баланс между катаболическими (биodeградативными) процессами и огромным количеством анаболических (биосинтетических) процессов.

Следовательно, ферменты можно определить как простые или сложные белки с каталитической активностью, необходимой для осуществления химических реакций в живом организме. Совокупность биохимических реакций, катализируемых ферментами, составляет основу обмена веществ всех живых организмов. Через ферментативный аппарат, регуляцию его активности происходит в значительной степени и

регуляция скорости метаболических реакций, их направленности, обеспечение клеточного гомеостаза.

В 1981–1982 году было установлено, что РНК также могут обладать каталитической активностью. Многие рибозимы естественного происхождения катализируют расщепление собственной молекулы или других молекул РНК, кроме того образование пептидной связи в белках происходит при помощи рРНК рибосомы.

Являясь катализаторами, ферменты имеют ряд общих с небиологическими катализаторами свойств:

1) ферменты не входят в состав конечных продуктов реакции и выходят из нее, как правило, в первоначальном виде, т.е. они не расходуются в процессе катализа;

2) ферменты не могут возбудить те реакции, протекание которых противоречит законам термодинамики, они ускоряют только те реакции, которые могут протекать и без них;

3) ферменты не смещают положения равновесия, а лишь ускоряют его достижение.

Ферменты по ряду признаков резко отличаются от неорганических катализаторов. *Первое различие* состоит в том, что ферменты «работают» в очень мягких условиях (низкая температура, нормальное атмосферное давление, среднее значение рН). Суть *второго различия* – высокая специфичность действия ферментов. Каждый фермент каталитически ускоряет протекание одной реакции или, в крайнем случае, группы реакций. *Третье различие* связано с белковой природой ферментов: термолабильность, зависимость от рН среды, зависимость от наличия активаторов и ингибиторов.

Поскольку все ферменты – вещества белковой природы, единственный метод их получения состоит в выделении их из биологических объектов. Выделяют ферменты теми же методами, что и белки. Однако имеется и ряд специфических приемов, позволяющих сохранить нативные свойства ферментов, например, экстракция глицерином, метод ацетоновых порошков (состоит в осаждении и быстром обезвоживании при температуре  $-10^{\circ}\text{C}$  тканей или вытяжек из них).

### Строение ферментов

Для ферментов характерны все закономерности строения, присущие белкам. Ферменты имеют четыре уровня организации молекул (рис. 61).

*Первичная структура* представляет собой последовательное соединение аминокислот и обусловлена наследственными особенностями организма, именно она в значительной степени характеризует индивидуальные свойства ферментов.

Первичная ... – Gly – Val – Tyr – Gln – Ser – Ala – Ile – Asn – Lys – Ala – ...



Рисунок 61 – Уровни организации ферментов

**Вторичная структура** ферментов организована в виде  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структур.

**Третичная структура** имеет вид глобулы и участвует в формировании активного центра.

**Четвертичная структура** представляет собой объединение нескольких субъединиц, каждая из которых характеризуется тремя уровнями организации молекул различающихся друг от друга, как в качественном, так и в количественном соотношении.

Ферменты всегда являются глобулярными белками, причем высшей может быть как третичная, так и четвертичная структура. На рис. 62 приведена трехмерная структура  $\alpha$ -химотрипсина:

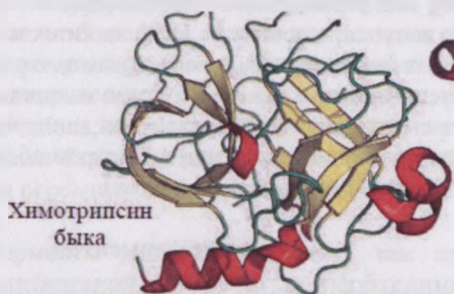


Рисунок 62 – Трехмерная структура химотрипсина быка

В природе различают простые и сложные ферменты. Простые ферменты состоят только из белкового компонента. Сложные ферменты со-

стоят из белкового и небелкового компонентов. Белковая часть называется *апоферментом*, небелковая, легко диссоциирующая с белковой частью, – *коферментом*; прочно связанная с белком – *простетической группой*, а молекула в целом – *холоферментом*.

Химическая природа важнейших коферментов была выяснена в 30-е гг. XX в. О. Варбурга, Р. Куна, П. Каррера. Так, роль коферментов играют большинство витаминов (Е, К, Q, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, С и др.). Эту роль могут выполнять соединения, построенные с участием витаминов (коэнзим А, НАД, ФАД, РНК), фосфорные эфиры некоторых моносахаридов.

Характерной особенностью сложных ферментов является то, что в отдельности ни белковая часть, ни добавочная группа не обладают каталитической активностью.

У простых ферментов, не имеющих добавочной группы, которая могла бы вступать в контакт с субстратом, такую функцию выполняет часть белковой молекулы – *активный центр*.

Предполагают, что активный центр простого фермента представляет собой уникальное сочетание определенных аминокислотных остатков.

Активных центров может быть 2, 4, 6, 8, в каждый входят 7–15 аминокислот. Наиболее часто в состав активных центров ферментов входят функциональные группы таких аминокислот:

- OH – группы серина, треонина, тирозина;
- SH – группы цистеина;
- NH – группа гистидина;
- COOH – группы глутамата и аспартата;
- NH<sub>2</sub> – группы аргинина и лизина.

Считают, что активный центр ферментов не является постоянным, геометрически ограниченным сайтом белковой макромолекулы, а представляет собой совокупность аминокислот, взаимодействующих с субстратом, причем число химических группировок и их способность взаимодействовать с субстратом может изменяться в зависимости от природы субстрата и степени нативности фермента.

Условность понятия активного центра связана также с тем, что его не удастся выделить в чистом виде. На рисунке 63 представлен активный центр рибонуклеазы – фермента, гидролизующего РНК, который состоит из множества мононуклеотидов. Каталитический центр этого фермента (непосредственно взаимодействующий с субстратом) представлен остатками гистидина (12) и (119), они принимают участие в катализе. Гистидин в 12-ом положении образует комплекс с гидроксильной группой рибозы, а гистидин (119) взаимодействует с соседним фосфатом.

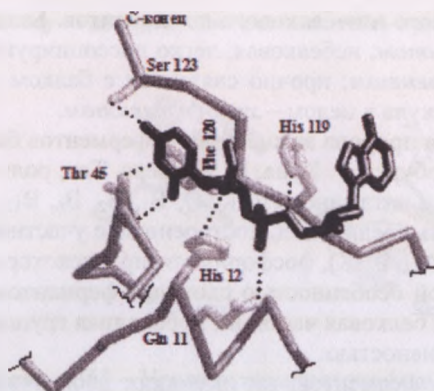


Рисунок 63 – Активный центр рибонуклеазы

Кроме активного центра у некоторых ферментов различают *субстратный* и *аллостерический* центры.

Под субстратным центром понимают участок молекулы фермента, ответственный за присоединение субстрата, который подвергается ферментативному превращению.

Аллостерический центр представляет собой участок молекулы фермента, в результате присоединения к которому определенного низкомолекулярного вещества изменяется третичная структура фермента, что приводит к изменению конфигурации активного центра и в итоге сопровождается изменением ферментативной активности. В реальных ферментах субстратный центр может совпадать с аллостерическим.

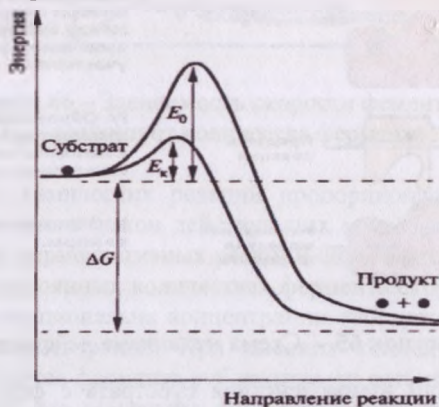
Ферменты локализованы во всех компартаментах клетки. Ядерные ферменты катализируют синтез информационных макромолекул, также процессы их созревания, функционирования и распада. В митохондриях действуют ферменты энергетического обмена, в аппарате Гольджи – ферменты, катализирующие созревание белков, в лизосомах – гидролитические ферменты. Значительное число ферментов ассоциировано с внешней и внутренней мембранами. Так, ферменты, защищающие клетку от действия чужеродных химических веществ, локализованы в эндоплазматическом ретикулуме.

### Механизм действия ферментов

Любая каталитическая реакция предполагает изменение скоростей как прямой, так и обратной реакции за счет снижения ее энергетики. При этом компоненты реакции должны быть переведены в *активированное (переходное состояние)*.

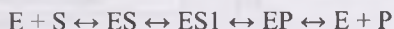
Достижение переходного состояния субстрата возможно двумя путями: придать реагирующим молекулам избыточную энергию (например, за счет увеличения температуры) или снизить энергию активации соответствующей химической реакции (рис. 64). Ферменты «помогают» субстратам принять переходное состояние за счет энергии связывания при образовании фермент-субстратного комплекса, за счет увеличения числа стадий химического процесса.

При взаимодействии фермента с субстратом можно выделить три этапа: 1-й этап – присоединение субстрата к макромолекуле фермента; 2-й этап – непосредственно ферментативная реакция; 3-й этап – отделение продуктов превращения субстрата от фермента.



**Рисунок 64** – Основное и переходное состояния реагирующих веществ:  
 $E_0$  – энергия активации реакции без катализатора;  
 $E_k$  – энергия активации в присутствии катализатора;  
 $\Delta G$  – разность свободной энергии реакции

Условно, это можно представить в виде схемы:



При взаимодействии фермента (E) с субстратом (S) на первой стадии образуется фермент-субстратный комплекс (ES), который поддерживается в основном за счет сил электростатического притяжения между ионизированными группами субстрата и фермента.

Затем, на второй стадии, субстрат под действием фермента, претерпевает изменения (ES1), делающие его более доступным для реакции. На третьей стадии протекает сама биохимическая реакция, в результате которой образуется фермент-продуктный комплекс (EP), и на последней,

четвертой, стадии он распадается на продукт реакции (P) и исходный фермент (E), вышедший из реакции в химически неизменном виде (рис. 65).

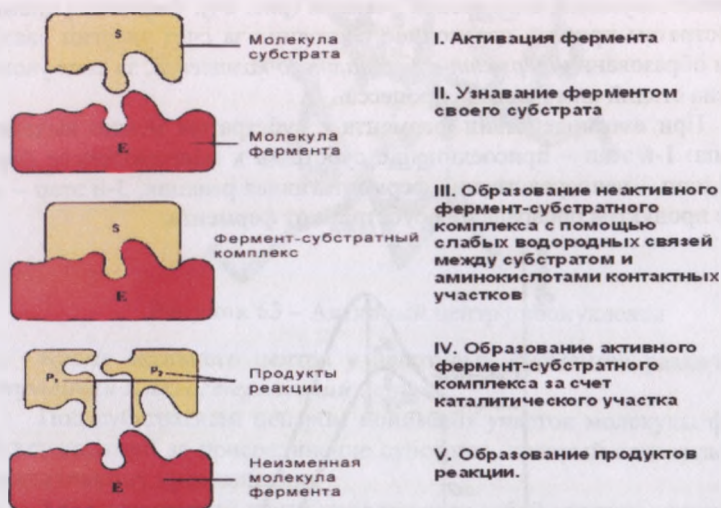


Рисунок 65 – Схема механизма действия фермента

Каждый этап взаимодействия субстрата с ферментом характеризуется своими константами скорости. Отношение суммы констант скорости распада фермент-субстратного комплекса к константе скорости образования фермент-субстратного комплекса называется **константой Михаелиса (K<sub>m</sub>)**.

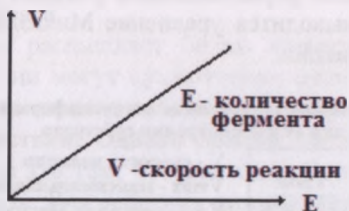
$$K_m = \frac{K_2 + K_3}{K_1}$$

K<sub>m</sub> – константа  
Михаелиса

Константа Михаелиса определяет сродство фермента к субстрату. Чем ниже константа Михаелиса, тем выше сродство фермента к субстрату, тем выше скорость катализируемой им реакции. По величине K<sub>m</sub> каталитические реакции можно поделить на быстрые (K<sub>m</sub> 10<sup>-6</sup> моль/л и меньше) и медленные (K<sub>m</sub> 10<sup>-2</sup> – до 10<sup>-4</sup>).

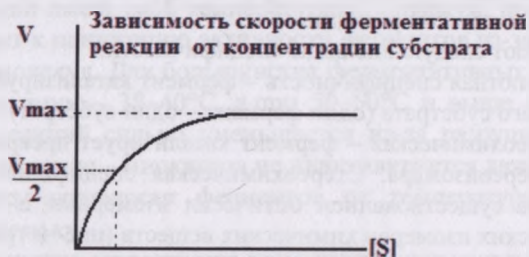
Скорость ферментативной реакции зависит от температуры, реакции среды, концентрации реагирующих веществ, количества фермента и других факторов.

1. Рассмотрим зависимость скорости реакции от количества фермента (рис. 66). При условии избытка субстрата скорость реакции пропорциональна количеству фермента, но при избыточном количестве фермента прирост скорости реакции будет снижаться, по причине снижения количества субстрата.



**Рисунок 66** – Зависимость скорости ферментативной реакции от количества фермента

2. Скорость химических реакций пропорциональна концентрации реагирующих веществ (закон действующих масс) (рис. 67). Этот закон применим и для ферментативных реакций, но с определенными ограничениями. При постоянных количествах фермента скорость реакции действительно пропорциональна концентрации субстрата, но, только в области низких концентраций. При высоких концентрациях субстрата наступит насыщение фермента субстратом, то есть наступит такой момент, когда уже все молекулы фермента задействованы в каталитическом процессе и прироста скорости реакции не будет.



**Рисунок 67** – Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Скорость реакции выходит на максимальный уровень ( $V_{max}$ ) и дальше уже не зависит от концентрации субстрата. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата следует определять в той части

кривой, которая ниже  $V_{max}$ . Технически легче определить не максимальную скорость, а  $V_{max}$ . Этот параметр является главной характеристикой ферментативной реакции и дает возможность определить константу Михаэлиса ( $K_m$ ).

**$K_m$  (константа Михаэлиса)** – это такая концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной. Отсюда выводится уравнение Михаэлиса – Ментен скорости ферментативной реакции.

Уравнение зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

$V = \frac{V_{max}}{1 + K_m/S}$	$V$ - скорость реакции $V_{max}$ - максимальная скорость $K_m$ - константа Михаэлиса $S$ - концентрация субстрата
---------------------------------	--

### Свойства ферментов

Ферменты обладают всеми свойствами белков. Однако они характеризуются рядом особых свойств: термолабильность, зависимость от pH среды, специфичность, подверженность влиянию активаторов и ингибиторов.

Свойства ферментов как биокатализаторов:

1) *Специфичность (избирательность) действия.* Под специфичностью понимают способность фермента ускорять протекание только одной биохимической реакции.

Выделяют следующие виды специфичности:

а) абсолютная специфичность – фермент катализирует превращение только одного субстрата (один фермент – один субстрат).

б) стереохимическая – фермент катализирует превращение определенного стереоизомера. Стереохимическая специфичность ферментов обусловлена существованием оптически изомерных L- и D-форм или геометрических изомеров химических веществ (цис- и транс-изомерия, в ароматических производных – орто-, мета-, пара-изомерия, изомерия положения в алифатических производных –  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, и т.д.). Так, например, известны оксидазы L- и D-аминокислот, хотя в природных белках обнаружены только L-аминокислоты. Каждый из видов оксидаз действует только на свой специфический стереоизомер. Наглядным примером стереохимической специфичности является бактериальная аспаратдекарбоксилаза, катализирующая отщепление  $CO_2$  только от L-

аспаргиновой кислоты с превращением ее в L-аланин, лактагдегидрогеназа превращает только L-лактат.

в) относительная специфичность – фермент катализирует превращение группы веществ с одним типом химической связи (один фермент – одна связь). Пример – пептидазы, эстеразы, гликозидазы. Относительная специфичность наблюдается при действии некоторых гидролитических ферментов, для них наибольшее значение имеет тип химической связи в молекуле субстрата.

Например, пепсин расщепляет белки животного и растительного происхождения, хотя они могут существенно отличаться друг от друга как по химическому строению и аминокислотному составу, так и по физико-химическим свойствам. Однако пепсин не расщепляет углеводы или жиры. Объясняется это тем, что местом действия пепсина является пептидная  $-CO-NH-$ связь. Для действия липазы, катализирующей гидролиз жиров на глицерин и жирные кислоты, таким местом является сложноэфирная связь. Аналогичной относительной специфичностью обладают также некоторые внутриклеточные ферменты, например гексокиназа, катализирующая в присутствии АТФ фосфорилирование почти всех гексоз, хотя одновременно в клетках имеются специфические для каждой гексозы ферменты, выполняющие такое же фосфорилирование.

2) *Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.* Температура является существенным фактором, влияющим на скорость ферментативной реакции. Для большинства ферментов, вовлеченных в односубстратную каталитическую реакцию, зависимость ее скорости от температуры описывается кривой (рис. 68). Ферментативные реакции, как и все химические реакции, ускоряются при повышении температуры (в 2–4 раза на каждые  $10^{\circ}C$ ). Однако скорость ферментативной реакции имеет свой температурный оптимум, превышение которого приводит к понижению активности ферментов из-за тепловой денатурации их молекул. Для большинства ферментативных реакций температурный оптимум –  $38-40^{\circ}C$ , а при  $50-60^{\circ}C$  и выше скорость ферментативных реакций сильно уменьшается из-за разрушения молекул фермента (исключение – миокиназа не инактивируется даже при  $100^{\circ}C$ ).

Зависимость активности ферментов от температуры называется *термолабильностью*.

Ферменты лучше сохраняются при низких температурах – их активность снижается, но денатурации не происходит. Это свойство используется в медицине для производства препаратов ферментов. При некоторых операциях необходимо снизить скорость обмена веществ. Тогда используют охлаждение органов (например, при пересадке почек, сердца и др. органов).

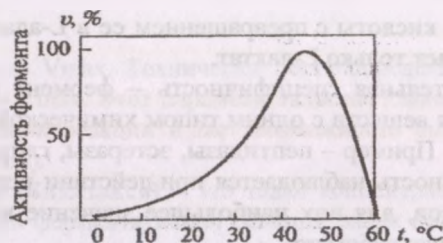


Рисунок 68 — Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

3) *Зависимость ферментативной активности от pH среды.* Ферменты крайне чувствительны к изменению концентрации водородных ионов. Это обусловлено такими причинами, как степень ионизации функциональных группировок, особенно в активном центре фермента, изменениями структуры белковой макромолекулы, а также влиянием pH на степень связывания фермента с субстратом. Так же как и температурная зависимость, pH-зависимость скорости ферментативной реакции представлена в виде кривой (рис. 69).

В отличие от термоллабильности, оптимум активности фермента от pH среды носит относительный характер, и в зависимости от структуры активного центра фермента может изменяться в различных пределах. Большинство ферментов наиболее активны при pH=6–8. Так, для фермента уреазы, ускоряющей реакцию гидролиза мочевины до аммиака и углекислого газа, оптимум pH равен 7, протолитический фермент пепсин работает при pH = 1,5–2,0, фермент аргиназа, принимающий участие в реакции гидролиза аргинина на мочевины и орнитин, активна при pH = 9,5–10,0.

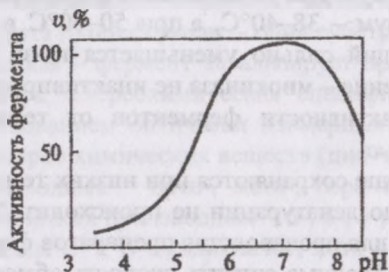
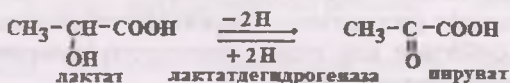


Рисунок 69 — Зависимость скорости реакции от pH среды

4) Ферменты ускоряют как прямую, так и обратную реакции (например, лактатдегидрогеназа):



5) Активность ферментов может изменяться под влиянием различных веществ, которые могут повышать (активаторы) или снижать (ингибиторы) скорость катализируемой реакции.

6) Ферменты в отличие от небиологических катализаторов проявляют более высокую активность и проявляют свою способность ускорять реакции в очень маленьких концентрациях (например, одна молекула карбангидразы способна расщепить 36 млн молекул  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ).

7) Ферменты, как и небиологические катализаторы, катализируют только те реакции, которые подчиняются II закону термодинамики и являются энергетически возможными. Ферменты не входят в состав конечных продуктов реакции, не влияют на константу равновесия реакции, а только увеличивают скорость ее достижения.

### Номенклатура ферментов

Номенклатура ферментов была принята V Международным конгрессом биохимиков (1961).

1. Систематическая номенклатура. Согласно систематической номенклатуре название фермента является сложным и состоит из 4 частей:

- 1) название субстрата, т. е. вещества на которое действует фермент;
- 2) название типа катализируемой реакции;
- 3) название одного из продуктов реакции;
- 4) к названию фермента добавляется окончание *-аза*.

Например, глюкозо-6 фосфатфосфогидролаза:

- субстрат – глюкозо-6-фосфат;
- продукт реакции – фосфорная кислота;
- тип реакции – гидролиз;
- окончание – «аза».

Также по систематической номенклатуре каждому ферменту был дан код (шифр), состоящий из 4-х цифр, которые обозначают: 1-класс, 2-подкласс, 3-подподкласс, 4-порядковый номер фермента в подподклассе.

Например: 1.1.1.27 – лактатдегидрогеназа, которая относится к I классу – оксидоредуктазам.

2. Рабочая номенклатура. Название фермента образуется из химического названия субстрата с добавлением суффикса «-аза» либо из названия химического превращения субстрата с добавлением суффикса «-аза».

Например: lipos (жир), фермент катализирующий его превращение называется «липаза». Лактатдегидрогеназа – это рабочее название фермента L-Лактат: НАД+ – оксидоредуктазы.

3. Тривиальное (исторически сложившиеся) название. Не дает представления о субстрате или типе химического превращения. Пример – пепсин, тромбин, трипсин, ренин.

### Классификация ферментов

В историческом плане существует 3 типа классификации ферментов. Самой старой является деление ферментов на 2 группы: *гидролазы* (ускоряют гидролитические реакции) и *десмолазы* (ускоряют реакции негидролитического распада или синтеза).

Классификация по числу субстратов предусматривает 3 типа ферментов.

1-й тип. Ферменты, катализирующие превращения двух субстратов в двух направлениях.



2-й тип. Ферменты, катализирующие превращения двух субстратов в прямом и одного в обратном направлении.



3-й тип. Ферменты, обеспечивающие обратимое видоизменение одного субстрата в другой.



Классификация по типу катализируемой реакции предусматривает деление ферментов на 6 классов. Деление внутри классов основано на более подробной характеристике катализируемой реакции и ее субстратной специфичности. Каждый фермент имеет тривиальное и систематическое название, а также кодовый номер (шифр). Основные классы ферментов указаны в таблице 6.

Таблица 6 – Классификация ферментов по типу катализируемой реакции

Номер класса	Название класса	Катализируемая реакция	Примеры ферментов или их групп
1	Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции (Перенос атомов водорода или электронов от одного вещества к другому)	Дегидрогеназа, оксидаза

Номер класса	Название класса	Катализируемая реакция	Примеры ферментов или их групп
2	Трансферазы	Перенос определенной группы атомов – метильной, ацильной, фосфатной или аминогруппы – от одного вещества к другому	Трансаминаза, киназа
3	Гидролазы	Процессы гидролитического расщепления различных связей	Липаза, амилаза, пептидаза
4	Лиазы	Негидролитическое присоединение к субстрату или отщепление от него группы атомов. При этом могут разрываться связи C-C, C-N, C-O или C-S	Деркарбоксилаза, фумараза, альдолаза
5	Изомеразы	Взаимопревращение различных изомеров	Изомераза, мутаза
6	Лигаза	Соединение двух молекул в результате образования новых связей	Синтетаза

### Области использования ферментов в биотехнологии

Ферменты нашли широкое применение в таких отраслях промышленности, как хлебопечение, пивоварение, виноделие, чайное, кожевенное и меховое производства, сыроварение, кулинария (для обработки мяса), см. таблицу 7.

Таблица 7 – Области применения ферментов

Ферменты	Область применения
<b>Гликозидазы:</b>	
α-амилаза	Гидролиз (ожижение) крахмала; Обработка текстильных изделий
глюкоамилаза	Осахаривание крахмала; получение глюкозы
Инвертаза	Производство кондитерских изделий
Пектиназа	Осветление вин и фруктовых соков

Ферменты	Область применения
<b>Гликозидазы:</b>	
Целлюлаза	Осахаривание целлюлозосодержащего сырья (соломы, древесных отходов)
<b>Протеазы:</b>	
Микробные протеазы	Добавки к детергентам; хлебопечение; осветление вин и пива; размягчение мяса; выделка кож
Бромелаин	Производство питательных смесей на основе гидролизатов белков
Папаин	Размягчение мяса; осветление пива
Трипсин	Размягчение мяса; выделка кож; медицина (заживление ран)
Реннин	Сыроделие
Липазы:	Модификация вкуса молочных продуктов
<b>Оксидоредуктазы:</b>	
Глюкозооксидаза	Удаление кислорода из пищевых продуктов; определение глюкозы в биологических жидкостях (аналитический реагент)
Каталаза	Удаление перекиси водорода после стерилизации молочных продуктов и в процессах отбеливания целлюлозы в производстве бумаги
<b>Изомеразы:</b>	
Глюкозоизомераза	Производство глюкозо-фруктозных сиропов
<b>Другие ферменты:</b>	
Нитрилгидратаза	Получение полиакриламида

Так, например кислые протеазы на основе высокоактивного продуцента *Aspergillus oryzae* применяют в производстве спирта и для получения белковых гидролизатов высокого качества в пищевой промышленности. В сочетании с амилазой эти ферменты также используют в хлебопекарной промышленности. Они улучшают качество и аромат хлеба, ускоряют созревание теста, увеличивают пористость и объем хлеба.

В молочной промышленности использование протеаз ускоряет созревание сыров вдвое и снижает их себестоимость на 10 %. В кулинарии обработка мяса пептидгидролазами *Streptomyces griseus* (протелином и проназой) перед его приготовлением значительно улучшает качество мясных блюд.

В текстильной промышленности процесс расшлихтовки (выравнивания поверхности) тканей ферментными препаратами класса протеаз

грибного происхождения ускоряется в 7–10 раз; эти же препараты служат для удаления белка серицина при размотке коконов тутового шелкопряда при производстве натурального шелка.

В кожевенном и меховом производстве применяют препараты протеиназ (протелин и протофрадин), являющихся внеклеточными ферментами стрептомицетов. При этом время, требуемое для осуществления необходимых процессов, сокращается в несколько раз, сортность и качество шерсти и кожи повышается.

Щелочные протеазы на основе высокоактивного продуцента *Bacillus licheniformis* вместе с целлюлазами являются компонентами стиральных порошков и моющих средств. Кроме того, протеолитические ферменты применяют при извлечении серебра из фотографических пленок и бумаги.

Важнейшей областью применения протеолитических ферментов является медицина. Нейтральные протеазы широко используются в лечении болезней желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, в хирургии для обработки гнойных ран, ожоговых и обмороженных поверхностей. Протеазы способствуют размягчению омертвевшей ткани, облегчая тем самым дренаж ран и ускоряя их заживление.

На втором месте по объему промышленного использования, после протеаз, находятся *амилолитические ферменты*, которые катализируют гидролиз различных типов гликозидных связей в крахмале, декстрани, гликогене и родственных полисахаридах. К ферментам, расщепляющим гликозидную связь внутри полисахарида (эндоамилазам), относятся  $\alpha$ -амилаза, пуллуланаза и циклодекстрин-глюкозилтрансфераза. Среди экзоамилаз выделяют  $\beta$ -амилазу, глюкоамилазу и амилоглюкозидазу.

Из амилолитических ферментов чаще используют  $\alpha$ -амилазу (из *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*) и глюкоамилазу (продуцируется представителями рода *Aspergillus*).  $\alpha$ -Амилаза – фермент, осуществляющий эндогидролиз  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов до мальтозы, декстринов и глюкозы.  $\alpha$ -Амилазы используются в процессе промышленного получения этанола как частичная замена дорогого солода в пивоварении, для улучшения качества муки в хлебопечении, а также в целлюлозно-бумажной промышленности. Кроме того, эти ферменты применяются в текстильной промышленности при изготовлении тканей и как добавки к моющим средствам.

Глюкоамилаза – экзофермент, атакующий крахмал с нередуцирующего конца полисахаридной цепочки, последовательно отщепляя глюкозные остатки с образованием преимущественно глюкозы. Препараты глюкоамилазы применяются для ферментативной обработки крах-

малосодержащего сырья в спиртовой, крахмалопаточной, хлебопекарной и пивоваренной промышленности.

*Целлюлолитические ферменты* – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз 1,4-гликозидных связей в молекуле целлюлозы с образованием набора олигосахаридов различной степени полимеризации вплоть до мономера – глюкозы.

Среди целлюлолитических ферментов микроорганизмов выделяют экзоглюканызы (целлобиогидролазы, отщепляющие от нередуцирующего конца целлюлозной цепи как остатки целлобиозы, целлотриозы, глюкозы, так и более крупные фрагменты), эндоглюканызы (гидролизующие  $\beta$ -1,4-гликозидные связи между остатками глюкозы в середине цепи),  $\beta$ -глюкозидазы (катализирующие превращение целлобиозы и целлотриозы в глюкозу).

Среди промышленных продуцентов микробных целлюлаз ведущую роль играют различные виды грибов рода *Trichoderma* (*T. reesei*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*). Это обусловлено высокой секреторной способностью их клеток, а также разнообразием продуцируемых ферментов с различной субстратной специфичностью, что делает эти продуценты универсальным объектом для получения различного рода биотехнологических продуктов.

Препараты целлюлаз на основе грибов *Trichoderma* выпускаются во многих странах ведущими компаниями – производителями промышленных ферментов, в частности Novozymes (Дания), Genencor International (США), Iogen (Канада), PrimAlko (Финляндия), Meiji Seika Kaisha Ltd. и Shin Nihon Chemical Co. (Япония) и др.

В пищевой промышленности целлюлазы используют для осветления соков и в пивоварении. Кроме того, целлюлолитические ферменты активно используются в целлюлозно-бумажной промышленности, в сельском хозяйстве (в процессе приготовления силоса). После полного гидролиза целлюлозу можно использовать как дешевый источник глюкозы.

С конца 1980-х гг. целлюлазы стали активно применяться для обработки текстильных изделий и материалов. Первым таким процессом стала ферментативная обработка джинсовых изделий, приводящая к частичному удалению красителя с поверхности ткани, в результате которой изделия приобретают внешний вид «вареных джинсов». В течение нескольких лет ферменты практически заменили пемзу и химические агенты, применявшиеся для этой цели ранее. Позднее целлюлазы стали широко использоваться для биополировки трикотажа и изделий на основе хлопчатобумажных и смесовых тканей. В результате такой обработки с поверхности материала удаляются ворсинки и неровности, материал

становится более гладким, приятным на ощупь, и после серии стирок ткань не скатывается, что повышает потребительские свойства изделий.

В последнее десятилетие целлюлазы также стали активно использоваться в качестве добавок к детергентам и моющим средствам, чтобы, воздействуя при стирке на текстильные материалы, содержащие в своем составе целлюлозные волокна, облегчить удаление грязей за счет гидролиза части поверхностных волокон.

По прогнозам ученых, основным потребителем ферментов в ближайшем будущем остается пищевая промышленность. Главное место среди этих энзимов занимают глюкоизомераза и глюкоамилаза, применяющиеся для приготовления обогащенных фруктозой кукурузных сиропов и составляющие около 50 % рынка пищевых энзиматических препаратов.

В последние годы ферменты стали применять в тонкой химической индустрии для осуществления таких реакций органической химии, как окисление, восстановление, дезаминирование, декарбоксилирование, дегидратация, конденсация, а также для разделения и выделения изомеров аминокислот L-ряда (при химическом синтезе образуются рацемические смеси L- и D-изомеров), которые используют в промышленности, сельском хозяйстве, медицине.

Для деградации и модификации антропогенных органических соединений, поступающих в окружающую среду, используют ферменты разных классов и в том числе лактазу, лигниназу, тирозиназу, монооксигеназу, диоксигеназу и др.

Перспективна для очистки сточных вод новая технология, основанная на использовании реакции пластеинообразования, открытой А. Я. Данилевским в 1886 г. Сущность работ Данилевского состоит в экспериментальном доказательстве обращения протеолиза и возможности синтеза белковоподобных веществ (пластеинов) под действием ряда протеолитических ферментов. Сточные воды содержат аминокислоты и пептиды, концентрация которых возрастает в результате гидролиза белковых компонентов отходов под воздействием пептидогидролаз микроорганизмов. Данная технология, активно внедряющаяся во Франции, нацелена на производство в промышленных масштабах кормовых белков из аминокислот и пептидов сточных вод.

Развитие клеточной и генной инженерии было бы невозможно, если бы в распоряжении исследователей не было целого набора специфических ферментов (рестриктаз, лигаз, синтетаз, ферментов избирательно разрушающих клеточную оболочку и др.). Так, в настоящее время в продаже имеется более 300 различных рестриктаз.

Ферменты широко используют в медицине, например в заместительной терапии в составе лечебных препаратов. Пероральное введе-

ние фенилаланин-аммиак-лиазы снижает уровень фенилаланина в крови при фенилкетонурии. Протеолитические ферменты, амилазу и липазу применяют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени.

В последние годы накопились данные об эффективности применения протеиназ в энзимотерапии злокачественных новообразований. Это объясняется большей проницаемостью мембран раковых клеток для гидролитических ферментов в сравнении с нормальными клетками, благодаря чему опухолевые клетки быстро лизируются при введении смеси протеиназ (препарат «Палайотин»).

*Протеолитические ферменты* – плазмин и активирующие его стрептокиназу и урокиназу используют для растворения тромбов в кровеносных сосудах и разжижения гноя; коллагеназу – для рассасывания рубцовых образований; эластазу – для задержки развития атеросклероза; лизоцим – для лечения конъюнктивитов; дезоксирибонуклеазу из стрептококка (стрептодорназа) – для лечения заболеваний верхних дыхательных путей и роговицы глаза.

*L-аспарагиназу* продуцируют *E. coli* и *Erwinia carotovora*. Фермент используют при химиотерапии некоторых форм лейкемии. L-аспарагиназа отщепляет одну аминогруппу от аспарагина, превращая его в аспарагиновую кислоту. Избирательность действия фермента определяется потребностью некоторых форм опухолевых клеток в аспарагине, тогда как нормальные клетки в аспарагине не нуждаются.

*Нейраминидазу* получают при культивировании *Vibrio cholera*. Фермент отщепляет остатки N-ацетилнейраминовой кислоты, входящей в мембрану некоторых опухолевых клеток, повышая, таким образом, их антигенную активность.

*β-лактамазы*, инактивирующие пенициллины и цефалоспорины, используются при определении стерильности этих антибиотиков или при микробиологическом анализе клинического материала от больных, получающих эти антибиотики. В терапевтических целях их используют в случае тяжелой аллергической реакции на β-лактамные антибиотики. Фермент вводят внутримышечно или внутривенно совместно с другими препаратами (адреналин, антигистаминные средства).

### Иммобилизованные ферменты

Иммобилизация фермента – метод, при котором молекулу биокатализатора включают в какую-либо фазу, отделенную от фазы свободного раствора, но способную обмениваться с ней молекулами субстрата, фактора или ингибитора.

В 1916 г. Дж. Нельсон и Е. Гриффин показали, что сахароза, сорбированная на угле, сохраняла свою каталитическую активность, но лишь в 1953 г. Н. Грубхофер и Д. Шлейт впервые осуществили ковалентные связывания амилазы, пепсина, РНКазы и карбоксипептидазы с нерастворимым носителем. В 1959 г. был применен принципиально новый методический прием – ковалентное связывание. С этого времени и ведется целенаправленная разработка гетерогенных катализаторов на основе ферментов.

В 1971 г. на первой конференции по инженерной энзимологии был узаконен термин «иммобилизованные ферменты». Однако в понятие «иммобилизация» в настоящее время вкладывают более широкий смысл, чем связывание на нерастворимом носителе, а именно – полное или частичное ограничение свободы движения белковых молекул.

Иммобилизованные ферменты имеют существенные преимущества. Так, например, они легко отделимы от реакционной среды. Это дает возможность остановить реакцию в любой момент, получить продукт, незагрязненный катализатором, и использовать ферментный препарат многократно. Иммобилизованные ферменты технологичны, что определяется возможностью вести биотехнологический процесс непрерывно и регулировать скорость катализируемой реакции и выход продукта путем изменения скорости потока.

Подбором соответствующих носителей и методов иммобилизации можно целенаправленно модифицировать такие свойства ферментов, как специфичность, рН-температурозависимость, а также стабильность фермента при денатурирующих воздействиях. Успешное использование иммобилизованных ферментов в значительной мере определяется выбором подходящего сочетания носителя и метода иммобилизации, а также знанием кинетики реакций с участием катализаторов.

В зависимости от природы носители делятся на органические и неорганические материалы.

**Органические полимерные носители.** Существующие органические полимерные носители можно разделить на два класса: природные и синтетические полимерные носители. Среди природных полимеров выделяют белковые, полисахаридные и липидные носители, а среди синтетических – полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные.

К преимуществам природных носителей следует отнести их доступность, полифункциональность и гидрофильность, а к недостаткам – биодеградируемость и достаточно высокую стоимость.

Из полисахаридов для иммобилизации наиболее часто используют целлюлозу, декстран, агарозу (агар) и их производные. Для придания химической устойчивости линейные цепи целлюлозы и декстрана попе-

речно сшивают эпихлоргидрином. В полученные сетчатые структуры довольно легко вводят различные ионогенные группировки. Химической модификацией крахмала сшивающими агентами (формальдегид, глиоксаль, глутаровый альдегид) синтезирован новый носитель – губчатый крахмал, обладающий повышенной устойчивостью к гликозидазам.

Из природных аминоксахаридов в качестве носителей для иммобилизации применяют хитин, который в значительных количествах накапливается в виде отходов в процессе промышленной переработки крабов и креветок. Хитин химически стоек и имеет хорошо выраженную пористую структуру.

Среди белков практическое применение в качестве носителей нашли структурные протеины, такие, как кератин, фиброин, коллаген и продукт переработки коллагена – желатина. Эти белки широко распространены в природе, поэтому доступны в значительных количествах, дешевы и имеют большое число функциональных групп для связывания фермента. Белки способны к биодеградации, что очень важно при конструировании иммобилизованных ферментов для медицинских целей. К недостаткам белков как носителей в этом случае следует отнести их высокую иммуногенность.

**Синтетические полимерные носители.** К ним относятся полимеры на основе стирола, акриловой кислоты, поливинилового спирта; полиамидные и полиуретановые полимеры. Большинство синтетических полимерных носителей обладают механической прочностью, а при образовании обеспечивают возможность варьирования в широких пределах величины пор, введения различных функциональных групп. Некоторые синтетические полимеры могут быть произведены в различных физических формах (трубы, волокна, гранулы). Все эти свойства полезны для разных способов иммобилизации ферментов.

**Носители неорганической природы.** В качестве носителей наиболее часто применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, а также силихромы, оксиды металлов. Их можно подвергать химической модификации, для чего носители покрывают пленкой оксидов алюминия, титана, гафния, циркония или обрабатывают органическими полимерами. Основное преимущество неорганических носителей – легкость регенерации. Подобно синтетическим полимерам неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.

Таким образом, к настоящему времени создано огромное число разнообразных носителей для иммобилизации ферментов. Однако для каждого индивидуального фермента, используемого в конкретном тех-

нологическом процессе, необходимо подбирать оптимальные варианты, как носителя, так и условий и способов иммобилизации.

## Методы иммобилизации ферментов

Существуют два принципиально различных метода иммобилизации ферментов: без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем (физические методы иммобилизации) и с образованием ковалентной связи между ними (химические методы иммобилизации), см. рис. 70. Каждый из этих методов осуществляется разными способами.



Рисунок 70 – Методы иммобилизации ферментов  
(Ф-молекула фермента)

**Физические методы иммобилизации ферментов** реализуются посредством адсорбции фермента на нерастворимом носителе, путем включения энзимов в поры поперечно сшитого геля, в полупроницаемые структуры или двухфазные системы.

*Адсорбция ферментов на нерастворимых носителях.* При адсорбционной иммобилизации белковая молекула удерживается на поверхности носителя за счет электростатических, гидрофобных, дисперсионных взаимодействий и водородных связей. Адсорбция была первым методом иммобилизации ферментов (Дж. Нельсон, Э. Гриффин, 1916), но и сейчас не потеряла своего значения и стала наиболее широко распространенным способом получения иммобилизованных ферментов в промышленности.

В литературе описано получение адсорбционным способом более 70 иммобилизованных ферментов с использованием главным образом таких носителей, как кремнезем, активированный уголь, графитовая сажа, различные глины, пористое стекло, полисахариды, синтетические поли-

меры, оксиды алюминия, титана и других металлов. Последние применяются наиболее часто. Эффективность адсорбции молекулы белка на носителе определяется удельной поверхностью (плотностью центров сорбции) и пористостью носителя. Процесс адсорбции ферментов на нерастворимых носителях отличается крайней простотой и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем (статистическим способом, при перемешивании, динамическим способом с использованием колонок). С этой целью раствор фермента смешивают со свежим осадком, например, гидроксида титана, и высушивают в мягких условиях. Активность фермента при таком варианте иммобилизации сохраняется практически на 100 %, а удельная концентрация белка достигает 64 мг на 1 г носителя.

К недостаткам адсорбционного метода следует отнести невысокую прочность связывания фермента с носителем. При изменении условий иммобилизации могут происходить десорбция фермента, его потеря и загрязнение продуктов реакции. Существенно повысить прочность связывания фермента с носителем может предварительная его модификация (обработка ионами металлов, полифункциональными агентами – полимерами, белками, гидрофобными соединениями, монослоем липида и пр.). Иногда, наоборот, модификации подвергается молекула исходного фермента, однако зачастую это ведет к снижению его активности.

*Иммобилизация ферментов путем включения в гель.* Способ иммобилизации ферментов путем включения в трехмерную структуру полимерного геля широко распространен благодаря своей простоте и уникальности. Метод применим для иммобилизации не только индивидуальных ферментов, но и мультиэнзимных комплексов и даже интактных клеток. Иммобилизацию ферментов в геле осуществляют двумя способами. В первом случае фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включенными в его ячейки молекулами фермента. Во втором случае фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние. Для первого варианта используют гели полиакриламида, поливинилового спирта, поливинилпирролидона, силикагеля, для второго – гели крахмала, агар-агара, каррагинана, агарозы, фосфата кальция.

Иммобилизация ферментов в гелях обеспечивает равномерное распределение энзима в объеме носителя. Большинство гелевых матриц обладает высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью и обеспечивает возможность многократного использования фермента, включенного в его структуру. Однако метод непригоден

для иммобилизации ферментов, действующих на водонерастворимые субстраты.

*Иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры.* Сущность этого способа иммобилизации заключается в отделении водного раствора фермента от водного раствора субстрата с помощью полупроницаемой мембраны, пропускающей низкомолекулярные молекулы субстратов и кофакторов, но задерживающей большие молекулы фермента. Разработано несколько модификаций этого метода, из которых интерес представляет микрокапсулирование и включение ферментов в липосомы.

Первый способ предложен Т. Чангом в 1964 г. и состоит в том, что водный раствор фермента включается внутрь замкнутой микрокапсулы, стенки которой образованы полупроницаемым полимером. Один из механизмов возникновения мембраны на поверхности водных микрокапсул фермента заключается в реакции межфазной поликонденсации двух соединений, одно из которых растворено в водной, а другое — в органической фазе.

Примером может служить образование на поверхности раздела фаз микрокапсулы, получаемой путем поликонденсации гексаметилендиамина — 1,6 (водная фаза) и галогенангидрида себадиновой кислоты (органическая фаза):



Размер получаемых капсул составляет десятки или сотни микрометров, а толщина мембраны — сотые доли микрометра.

Достоинства метода микрокапсулирования — простота, универсальность, возможность многократного использования нативного фермента (фермент может быть отделен от непрореагировавшего субстрата и продуктов реакции процедурой простого фильтрования). Особенно существенно, что методом микрокапсулирования могут быть иммобилизованы не только индивидуальные ферменты, но и мультиэнзимные комплексы, целые клетки и отдельные фрагменты клеток. К недостаткам метода следует отнести невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов.

Близким к инкапсулированию методом иммобилизации можно считать включение водных растворов ферментов в липосомы, представляющие собой сферические или ламеллярные системы двойных липидных бислоев. Впервые данный способ был применен для иммобилизации ферментов Дж. Вайсманом и Дж. Сессом в 1970 г. Для получения липосом из растворов липида (чаще всего лецитина) упаривают органиче-

ский растворитель. Оставшуюся тонкую пленку липидов диспергируют в водном растворе, содержащем фермент. В процессе диспергирования происходит самосборка бислойных липидных структур липосомы, содержащих включенный раствор фермента.

Ферменты, иммобилизованные путем включения в структуру липосом, используют преимущественно в медицинских и научных целях, ибо значительная часть ферментов в клетке локализована в составе липидного матрикса биологических мембран, поэтому изучение липосом имеет большое значение для понимания закономерностей процессов жизнедеятельности в клетке.

Другие приемы иммобилизации ферментов, основанные на физических методах, менее распространены по сравнению с описанными выше.

**Химические методы иммобилизации ферментов.** Иммобилизация ферментов путем образования новых ковалентных связей между ферментом и носителем – наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов.

В отличие от физических методов этот способ иммобилизации обеспечивает прочную и необратимую связь фермента с носителем и часто сопровождается стабилизацией молекулы энзима.

Фермент отделяют от носителя с помощью вставки (сшивки, спейсер), в роли которой чаще всего выступают бифункциональные и полифункциональные агенты (бромциан, гидразин, сульфурилхлорид, глутаровый диальдегид и др.). Например, для выведения галактозилтрансферазы из микроокружения носителя между ним и ферментом вставляют последовательность:  $-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-$ .

В этом случае структура иммобилизованного фермента включает носитель, вставку и фермент, соединенные между собой ковалентными связями (рис. 71).

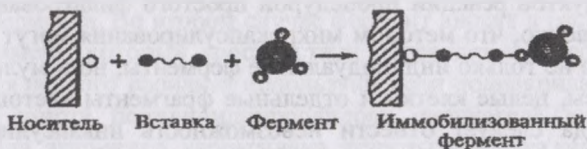


Рисунок 71 – Схема иммобилизации фермента химическим методом

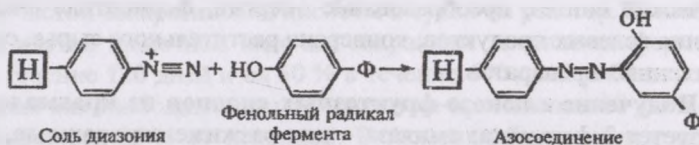
Принципиально важно, чтобы в иммобилизации фермента участвовали функциональные группы, не существенные для его каталитической функции. Так, гликопротеины обычно присоединяют к носителю через углеводную, а не через белковую часть молекулы фермента.

Число методических приемов, разработанных для осуществления ковалентной иммобилизации ферментов, исключительно велико. Все методы химической иммобилизации классифицируют в зависимости от природы реакционной группы носителя, вступающей во взаимодействие с молекулой фермента. Ниже представлен ряд примеров, иллюстрирующих некоторые способы химической иммобилизации ферментов.

*Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих гидроксо-группами.* Наиболее распространенным методом образования ковалентной связи между ферментом и полисахаридным носителем или синтетическим диольным соединением является бромциановый метод, который был предложен Р. Аксеном, Дж. Поратом и С. Эрнбаком в 1967 г. При обработке носителя бромцианом возникают реакционноспособные цианаты и имидокарбонаты, которые при взаимодействии с нуклеофильными аминогруппами фермента образуют производные изомочевины и уретанов:

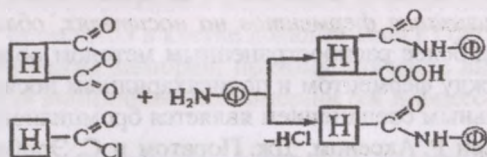


*Иммобилизация ферментов носителях, обладающих аминогруппами.* Первичные аминогруппы носителя, связанные с ароматическим кольцом, предварительно превращают в соли диазония, которые затем подвергают разнообразным реакциям сочетания. В реакции сочетания вступают фенольные, имидазольные, аминные, гуанидиновые, тиольные группы белков. Так, в щелочной среде фенольные радикалы тирозина образуют прочные азо-соединения, в составе которых белок связан с носителями:



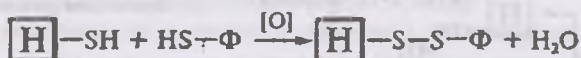
Существенно, что *p*-аминофенильные функции могут быть легко введены в разнообразные носители.

*Иммобилизация на носителях, обладающих активированными производными карбоксильной группы.* Наиболее часто для соединения аминокрупп белка с ацильными группировками носителя используют ангидриды, галогенангидриды, активированные эфиры и другие производные карбоновых кислот. Например,



Реакционная способность производных карбоновых кислот в реакциях ацилирования аминокрупп фермента уменьшается от галогенангидридов до эфиров.

*Иммобилизация на носителях, обладающих сульфгидрильными группами.* Сульфгидрильные группы носителя и фермента легко окисляются с образованием дисульфидных связей под действием кислорода воздуха:



Иммобилизация путем химического присоединения биокатализатора к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи. Несмотря на это, методы ковалентной иммобилизации ферментов все еще малодоступны для промышленного использования в связи со сложностью и дороговизной их применения.

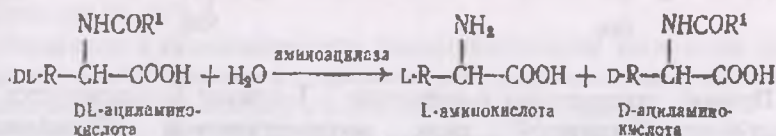
### Крупномасштабные производства с использованием иммобилизованных ферментов

Иммобилизованные ферменты применяются в различных сферах – органический синтез, преобразование энергии, ферментная аналитика, получение целевых продуктов, конверсия растительного сырья, создание лекарственных препаратов.

**1. Получение глюкозо-фруктозных сиропов из крахмала.** Здесь используется 3 фермента: амилаза – для разжижения крахмала, глюкоамилаза – для осахаривания крахмала (трансформации в глюкозу) и глюкозоизомеразу – для изомерзации глюкозы в более сладкий сахар фруктозу. Первая промышленная установка для превращения глюкозы

во фруктозу с помощью иммобилизованной глюкоизомеразы была запущена лишь в 1973 г. (компания «Клинтон Корн», США).

## 2. Получение оптически активных L-аминокислот из их рацемических смесей



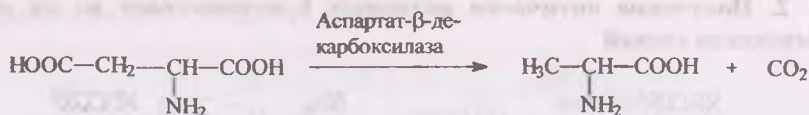
Разделение рацемических смесей на составляющие их оптические изомеры (представляющее труднейшую задачу) явилось первым промышленным процессом с использованием иммобилизованных ферментов. Этот процесс был осуществлен в Японии в 1969 г. (компания «Танабе Сейяку») с помощью аминокислазы, иммобилизованной на ДЕАЕ-целлюлозе.

## 3. Синтез L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония

Аспарагиновая кислота широко употребляется в качестве пищевой добавки (подсластитель и подкислитель).

Первая в мире промышленная установка для синтеза L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония была запущена в 1973 г. в Японии (фирма «Танабе Сейяку»); на основе иммобилизованных клеток *E. coli*, содержащие аспарат-аммиаклиазу в полиакриламидном геле. Полиакриламидный гель с иммобилизованными микробными клетками формируют в виде кубиков размером 2–3 мм, которыми заполняют колонку объемом 1 м<sup>3</sup>. Через колонку пропускают раствор фумарата аммония. При подкислении выходящего из колонки элюата до pH 2,8 и охлаждении до 15°C из него выкристаллизовывается аспарагиновая кислота в виде препарата 100 %-ой чистоты. Процесс получения аспартата осуществляется в непрерывном режиме. Производительность процесса – 1700 кг чистой аспарагиновой кислоты в сутки на реактор. Иммобилизованные клетки кишечной палочки сохраняют активность фермента на 80 % в течение 120 дней и на 50 % в течение 600 дней работы реактора, в то время как свободные клетки – всего на протяжении 10 дней с уровнем активности 25 % от исходной. В Армении был налажен промышленный процесс получения аспартата особой степени чистоты с использованием иммобилизованной аспарат-аммиак-лиазы на базе научных разработок химфака Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (1974).

4. Синтез L-аланина из L-аспарагиновой кислоты. Основной промышленный способ получения L-аланина – ферментативное декарбоксилирование L-аспарагиновой кислоты:



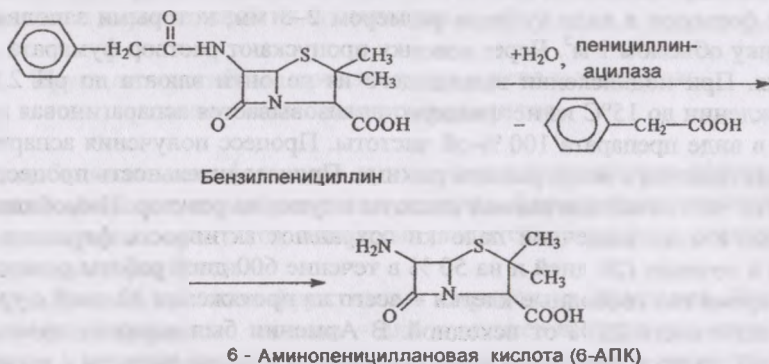
Процесс превращения L-аспартата в L-аланин катализируется аспарат-β-декарбоксилазой ряда микроорганизмов (*Pseudomonas dacunhae*, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter pestifer*), иммобилизованных в полиакриламидном геле, каррагинане или полиуретане. Биореакторы японской фирмы «Танабе Сейяку», производит этим способом 10 тонн аланина в месяц. В качестве сырья используют фумарат аммония. Процесс получения L-аланина становится двустадийным и реализуется в двух последовательно расположенных реакционных колонках. На первом этапе фумарат аммония превращается в L-аспарагиновую кислоту, которая без выделения из реакционной среды на втором этапе претерпевает β-декарбоксилирование с образованием аланина.

5. Синтез L-яблочной кислоты из фумаровой кислоты.

6. Получение безлактозного молока.

7. Получение сахаров из молочной сыворотки.

8. Получение 6-аминопенициллановой кислоты. Ключевым полупродуктом для получения полусинтетических антибиотиков пенициллинового ряда является 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК):



Со второй половины 70-х годов XX века вся 6-АПК, выпускаемая в России, и значительная часть 6-АПК, получаемой в Италии, производят-

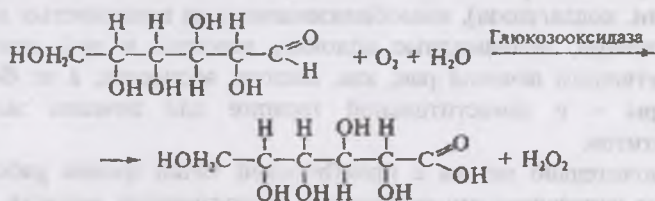
ся с помощью иммобилизованных ферментов. На итальянских фирмах применяют фермент, иммобилизованный путем включения клеток *E. coli* в волокна триацетата целлюлозы, на российских предприятиях используют бактериальные клетки, им мобилизованные в полиакриламидном геле. Переход к технологии, в которой применяются иммобилизованные бактериальные клетки, обеспечивает высокий выход 6-АПК, составляющий 80–85%.

Внедрение в промышленность биокаталитической технологии производства 6-АПК привело к существенному увеличению выпуска полусинтетических пенициллинов и снижению их себестоимости.

### Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов

Высокая эффективность биологических катализаторов и специфичность их действия делают ферменты идеальными реагентами для аналитической химии. Благодаря этим особенностям с помощью ферментов обнаруживаются вещества при предельно низкой концентрации (до  $10^{-12}$  моль/л) в присутствии множества других соединений.

К настоящему времени созданы искусственные аналитические системы различных конструкций (биосенсоры, датчики, ферментные электроды, проточные анализаторы), потенциометрического, амперометрического, калориметрического, пьезоэлектрического и оптического типа, содержащие иммобилизованные ферменты и клетки и предназначенные для автоматического детектирования продуктов энзиматических превращений. Например, если использовать иммобилизованную глюкозооксидазу, то концентрацию окисляемой кислородом глюкозы определяют, регистрируя количество выделившегося в ходе реакции пероксида водорода полярографическим, колориметрическим или люминесцентным методом.



Технологические варианты сенсоров с иммобилизованными ферментами весьма разнообразны – колонки, трубки, полые волокна и пр. С их помощью на практике определяют концентрацию широкого спектра соединений – глюкозы, аминокислот, мочевины, пенициллина, АТФ, НАДН, ФМН, стероидов, триглицеридов, желчных кислот и многих других. Так, американскими исследователями сконструирован мик-

родатчик на основе глюкозооксидазы и рутениевого красителя, иммобилизованных в полиакриламидной матрице с использованием субмикронных оптических волокон. Микробиосенсор, не вызывая повреждений, может быть введен в клетку и даже в отдельные ее компартменты для измерения содержания в них глюкозы и кислорода. Предложены датчики на базе иммунодетекции для проведения экспресс-анализов на присутствие производных диоксина и оценки содержания биогенных аминов (с помощью моноамино-оксидазы) в пищевых продуктах в связи с процессами их старения. Для определения мочевины ферментным электродом требуется всего 30 с.

Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов помогают выполнять десятки быстрых и точных анализов при диагностике заболеваний, контролировать содержание вредных веществ (инсектицидов, пестицидов, удобрений) в пищевых продуктах и в воздухе. Биосенсоры нашли применение в решении аналитических задач в химической и микробиологической промышленности, а также в научных исследованиях.

**Иммобилизованные ферменты в медицине.** Иммобилизованные ферменты имеют огромное значение для медицины. В частности, большой рынок сбыта занимают тромболитические ферменты, предназначенные для борьбы с сердечнососудистыми заболеваниями. Так, в отечественную клиническую практику внедрен препарат «стрептодеказа», содержащий стрептокиназу – активатор предшественника протеиназы плазмينا, предотвращающий образование тромба в кровеносной системе.

Ферменты, разрушающие некоторые незаменимые аминокислоты (например, аспарагиназа), используют для борьбы со злокачественным ростом опухолей. Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, субтилизин, коллагеназа), иммобилизованные на волокнистых материалах (целлюлоза, полиамидные волокна, декстран и др.), применяют для эффективного лечения ран, язв, ожогов, абсцессов, а их белковые ингибиторы – в заместительной терапии для лечения эмфиземы и панкреатитов.

Исключительно важны с практической точки зрения работы, посвященные направленному транспорту лекарственных веществ. В этом отношении особенно выгодны инкапсулированные ферменты типа искусственной клетки. Так, микрокапсулы, стенки которых представлены оболочкой эритроцита («тень эритроцита»), а их содержимое заполнено ферментом аспарагиназой, переносятся кровотоком к зонам скопления аспарагина и поэтому применяются для лечения аспарагинзависимых опухолей, в частности саркомы. Колонки, заполненные микрокапсулами

с ферментом, используют для диализа в аппарате «искусственная почка», которая работает в 100 раз эффективнее обычного аппарата.

Таким образом, использование иммобилизованных ферментов во многих жизненно важных отраслях народного хозяйства становится все более массовым. Выгодное сочетание избирательности и эффективности с долговечностью и стабильностью иммобилизованных ферментов в корне меняет химическое производство, способы добывания сырья, способствует созданию новых биотехнологических процессов и методов терапии, совершенствует медицинскую диагностику, анализ, органический синтез и оказывает огромное влияние на образ жизни человека.

### **Контрольные вопросы:**

- 1 Какова химическая природа ферментов?
- 2 Что означают понятия активный и аллостерический центры ферментов?
- 3 Перечислите основные свойства ферментов.
- 4 Объясните смысл основных параметров кинетики ферментативных реакций.
- 5 Перечислите классы ферментов и катализируемые ими реакции. Проиллюстрируйте ответ примерами химических реакций.
- 6 Приведите примеры использования ферментов в различных областях биотехнологии.
- 7 Что означает термин «иммобилизованные ферменты»?
- 8 Какие методы применяют для иммобилизации ферментов?
- 9 Перечислите промышленные процессы получения целевых продуктов на основе иммобилизованных ферментов.

## ТЕМА 10. КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

### История культивирования клеток и тканей растений

Термин «культура клеток, тканей и органов растений» применяется к следующим асептически выращиваемым частям растения: изолированным зародышам, изолированным органам (кончики корней, меристемы побегов, листовые примордии, части молодых цветков и плодов), каллусной ткани, суспензионной культуре, культуре протопластов.

Попытки культивировать изолированные с растений ткани проводились с давних времен. В истории развития этого метода можно выделить несколько этапов.

**Первый этап.** 1892–1902 гг. Начало работ с культурой клеток тканей растений. Работы немецких ученых Г. Фехтинг (1892), К. Рехингер (1893) и Ф. Хаберланд (1902). Хаберланд впервые выдвинул гипотезу о тотипотентности растительной клетки. Культивирование тканей и корневых волосков растений на растворах сахарозы. Каллусообразование у сегментов стеблей одуванчика и тополя.

**Второй этап.** 1902–1922 гг. Начало культивирования тканей животных (Р. Г. Харрисон, 1907; А. Каррель, 1911, 1913). Авторы пытались культивировать ткани и клетки животных в плазме крови и зародышевой жидкости.

**Третий этап.** 1922–1932 гг. А. Роббинс и Г. Котте (1922) показали возможность культивирования меристем кончиков корней томата на синтетической среде, которая была твердой; однако ткани погибали.

**Четвертый этап.** 1932–1940 гг. начало успехов в биотехнологии растений. Француз Р. Готре (1932–1934) и американец Ф. Уайт (1932–1934) повторили опыты А. Роббинса и Г. Котте, но и стали пересаживать кончики культивируемых корней на свежую питательную среду. Готре получил каллусы из древесных растений, а Ф. Уайт – показал неограниченный рост растительных опухолей при пересадках на свежие среды.

**Пятый этап.** 1940–1960 гг. Ф. Скуг и К. Миллер (1955) открыли фитогормоны цитокинины, стимуляторы деления клеток растений. Было установлено, что соотношение фитогормонов влияет на деление клеток эксплантов, рост каллусной ткани и морфогенез. Показано, что природные экстракты (эндосперма кукурузы, кокосовое молоко и т. д.) поддерживают деление клеток *in vitro*. Ж. Морель разработал технологию микроклонального размножения растений.

**Шестой этап.** 1960–1975 гг. Э. Коккинг (1960) получил клетки без клеточной стенки, или протопласты, из плодов и корней томата, показал

возможность их культивирования в контролируемых условиях. Дж. Пауэр с коллегами смог добиться слияния протопластов.

**Седьмой этап.** С 1976 г. Бурное развитие исследований биотехнологии растений. Разработка методов слияния протопластов, экспериментального мутагенеза, клеточной селекции, получения гаплоидов. В 1980-х годах были разработаны методы слияния протопластов и получения гибридов из неполовых клеток растений. Использование агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*, позволило создать трансгенные растения.

В Казахстане работы с культурой тканей начались в 1975 году в Алматы в Главном ботаническом саду, а затем в Институте молекулярной биологии и биохимии, Институте ботаники. Основателями казахстанской школы биотехнологов являются М. Айтхожин и И. Рахимбаев.

### Культура каллусных тканей

Методы культивирования изолированных фрагментов растений основаны на исследовании такого важного свойства растительной клетки, как тотипотентность (свойство клетки реализовывать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма).

Основным типом культивируемой растительной клетки является каллусная.

Каллусная культура – это неорганизованная профилирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т. е. становятся дифференцированными.

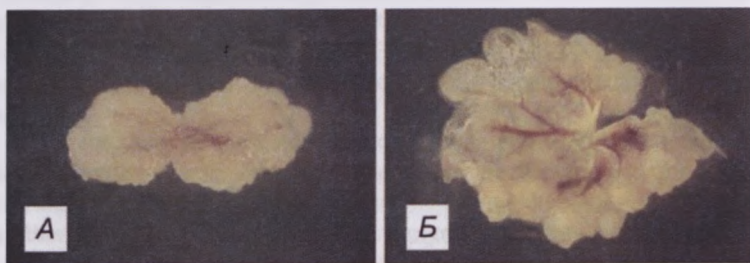
Каллусная клетка, в результате деления которой возникает каллусная ткань или каллус, представляет один из типов клеточной дифференцировки, присущей высшему растению. Для растения каллус является тканью, возникающей под действием «раневых гормонов» путем неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток при исключительных обстоятельствах (обычно при травмах) и функционирующей непродолжительное время (рис. 72). Эта ткань защищает травмированное место, накапливает питательные вещества для анатомической регенерации или генерации утраченного органа.

Образование каллуса не всегда связано с травматическим воздействием. Каллус может возникнуть и в результате пролиферации внутренних тканей экспланта без связи с поверхностью среза из-за нарушения гормонального баланса. Растущий каллус разрывает слои ткани и развивается на поверхности.



**Рисунок 72** – Каллус на травмированной виноградной лозе

Каллус, может образовываться на изолированных кусочках ткани (эксплантах) *in vitro*. Для получения культивируемых каллусных клеток фрагменты тканей различных органов высших растений – корней, листьев, стеблей, пыльников, зародышей (экспланты) помещают на искусственную среду, содержащую ауксины (рис. 73).



**Рисунок 73** – Экспланты листьев на искусственной питательной среде *in vitro*: А – каллусная культура на сегментах черешка лапчатки скальной; Б – на сегментах листовой пластинки лапчатки скальной

Основным условием превращения растений клетки в каллусную является присутствие в питательной среде фитогормонов.

Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, приготавливающие ее к делению, а цитокинины – пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток.

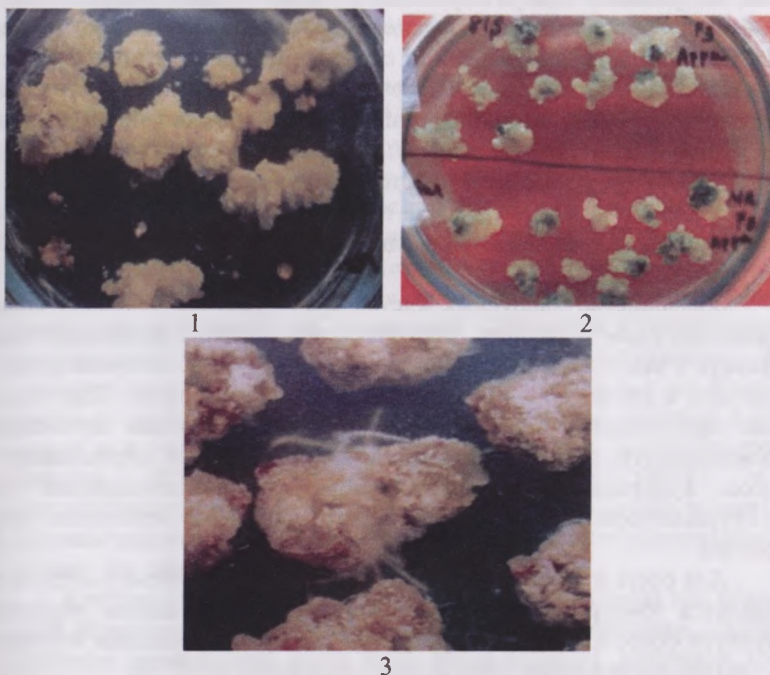
В качестве ауксинов используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д),  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК), индолилмасляную кислоту (ИМК), индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,5–10

мг/л в зависимости от вида экспланта. В качестве цитокининов применяют зеатин, кинетин и др.

Каллусная ткань, выращиваемая поверхностным способом на агаре, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющих строго определенной анатомической структуры. Однако было бы ошибочно думать, что каллусные ткани однообразны. Исследователи делят их на типы по таким морфологическим признакам, как цвет, консистенция, характер поверхности, а также по интенсивности роста и способности к зеленению.

Цвет каллусной ткани в основном бывает белого или желтоватого, реже светло-зеленого цвета. Темно-коричневая окраска возникает чаще при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов. Последние окисляются в хиноны. Для избавления от них в питательные среды вносят антиоксиданты.

В зависимости от консистенции каллусные ткани бывают рыхлыми, среднеплотными и плотными (рис. 74).



**Рисунок 74 – Консистенция каллусной ткани:**  
1 – рыхлая; 2 – средней плотности; 3 – плотная

Рыхлые, состоят из сильно оводненных клеток, легко распадающиеся на отдельные мелкие агрегаты; среднеплотные, с хорошо выраженными меристематическими очагами (клетки могут быть отделены друг от друга сильным взбалтыванием либо встряхиванием); плотные (клетки очень мелкие, не отделяются взбалтыванием, выражены зоны с камбиальными и трахеиподобными элементами).

«Разрыхлить» каллус можно путем исключения из питательной среды солей  $\text{Ca}^{2+}$  (в том числе, пантотената кальция). Для этой же цели можно при выращивании в качестве ауксина использовать 2,4-Д. Значительного разрыхления каллуса можно добиться с помощью ферментов — 0,2 мг/л пектиназы и 0,01 мг/л целлюлазы. Таким образом, консистенция каллуса в значительной степени зависит от состава среды.

В случае получения первичного каллуса при оптимально подобранной среде часть эксплантов обычно за 3–8 недель образует каллусы в количестве достаточном для пересадки. Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирания каллусных клеток, полученный каллус переносят на свежую питательную среду. Эту операцию называют *пассированием*. Первичный каллус разделяют на части, которые в дальнейшем культивируются отдельно. Следует обратить внимание на размеры кусочков каллуса, переносимых на свежую питательную среду: если они слишком малы, то дальнейший рост каллуса может быть угнетен. Оптимальный размер пересаживаемого каллуса зависит от вида растения. В некоторых случаях применяется способ субкультивирования без деления полученного каллуса на отдельные кусочки, при котором после пересадки на свежую среду, каллус продолжает расти всем объемом.

Большинство каллусных клеток могут расти в условиях сильного освещения или в темноте, поскольку не способны фотосинтезировать. Вместе с тем свет может выступать как фактор, обеспечивающий морфогенез и активирующий процессы вторичного синтеза. Для обеспечения протекания данных процессов важны не только интенсивность освещенности, но и качество света. Для достижения оптимизации процесса культивирования часто используют люминесцентные лампы с интенсивностью около 1000 люкс и непрерывным «холодным белым» светом.

Для роста и развития большинства каллусных культур оптимальной является температура 26°C. Однако индукция процессов морфогенеза требует более низких температур (18–20°C). Оптимальная влажность в культуральной лаборатории должна составлять 60–70 %.

Питательные среды для культивирования содержат:

- минеральные соли;

- углеводы;
- витамины;
- регуляторы роста;
- аминокислоты.

Основой всех питательных сред для выращивания изолированных тканей растений является смесь минеральных солей, представленных как **макро-**, так и **микроэлементами**. Азот входит в среды в виде или аммонийной соли, фосфор – в виде фосфата, сера – в виде сульфата, железо вводится в виде неорганических солей и солей органических кислот и в форме хелата. Последний обеспечивает доступность железа при pH до 8,0 в течение всего периода роста культуры. В отсутствие хелатирующего агента недостаток железа может возникнуть очень быстро. Все среды содержат также ионы  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ .

Почти все среды содержат ряд микроэлементов: В, Мп, I, Си, Zn, Мо, Со. Особенно необходимы они для суспензионных культур клеток.

**Источник углерода** вводится в состав среды в виде сахарозы или глюкозы, обычно в концентрации 20–40 г/л. Другие углеводы хотя и используются для некоторых видов растений в культуре, в целом являются менее пригодными.

**Витамины.** Особенно важны витамины группы В: тиамин ( $B_1$ ), рибофлавин ( $B_2$ ), пиридоксин ( $B_6$ ). Многие культуры нуждаются также в никотиновой, фолиевой, пантотеновой кислотах, мезоинозите. Хотя большинство тканей в культуре способно к биосинтезу витаминов, но этого количества оказывается недостаточно для выполнения метаболических функций. Поэтому дополнительное внесение витаминов в питательную среду стимулирует рост тканей.

**Фитогормоны** – соединения, которые участвуют в регуляции физиологических процессов у растений. Для роста и дифференциации растительных клеток необходимы ауксины и цитокинины. Только культура тканей опухолей и культура «привыкших» тканей способны расти на средах без регуляторов роста. В качестве ауксинов для получения каллуса и его поддержания используются:  $\beta$ -индолилуксусная кислота (ИУК),  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота (НУК) и 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). Для того чтобы вызвать образование каллуса, обычно используют более высокие концентрации ауксинов, чем для его последующего роста.

Кинетин (6-фурфуриламинопурин) вводится в среду как обязательный компонент для индукции деления клеток. Некоторые другие адениновые производные могут быть более активны, например, природный цитокинин – зеатин. Однако это очень дорогой и дефицитный фитогормон, к тому же он термолабилен, поэтому его нельзя автоклави-

ровать. Другой цитокинин – это широко применяемый 6-бензиламинопурин (БАП), который активнее кинетина на много порядков.

**Органические добавки.** Это могут быть различные экстракты (солодовый экстракт дрожжевой экстракт, картофельный экстракт, вытяжки из разных органов растений, из опухолевых тканей), соки (березовый, томатный, апельсиновый) незрелые эндоспермы кокосового ореха, кукурузы и других злаков гидролизат казеина, смесь аминокислот. Наибольшим стимулирующим действием обладают незрелые эндоспермы ряда растений, особенно кокосового ореха, так называемое кокосовое молоко. Это связано с особой ролью эндосперма, который служит питательным субстратом и источником гормонов для развивающегося зародыша. Однако в последнее время таких добавок стараются избегать в связи с трудностями воспроизведения результатов и наличия в них неизвестных факторов роста.

Большое значение для нормального роста и развития растений *in vitro* как на агаризованных, так и в жидких средах имеет ее рН. В нативных условиях растительная клетка функционирует в узких границах концентрации водородных ионов. От величины рН зависят структура и активность макромолекул, прежде всего белков-ферментов в самой ткани. Кроме того, рН влияет на устойчивость и усвояемость компонентов питательной среды, в первую очередь регуляторов роста и витаминов. При низких рН не желатинизируется агар, поэтому рН питательных растворов обязательно доводится до требуемого уровня путем добавления щелочей и кислот.

Оптимальный рост культуры клеток растений обычно происходит на среде с начальными значениями рН от 5 до 6. Среда, содержащая такие неопределенные органические компоненты, как гидролизат казеина и дрожжевой экстракт; обычно хорошо забуферены, поэтому рН среды в процессе роста культуры меняется слабо. В средах без этих веществ сдвиги рН в ходе культивирования могут быть весьма значительными. Особенно важно для суспензионной культуры клеток.

В качестве гелеобразующего вещества для приготовления твердых питательных сред используется **агар-агар**. Агар – полисахарид, содержащий целый ряд примесей, поэтому его промывают проточной водой в течение 4–6 часов. Содержание агара в питательных средах колеблется в зависимости от требований культивируемой ткани. Первые успешные результаты по культивированию тканей растений были получены именно на агаризованных средах в 30-х годах нашего века Р. Готре во Франции и Ф. Уайтом в США.

Основными компонентами питательных сред для культуры клеток и тканей растений являются минеральные соли (макро- и микроэлементы), источник углеродного питания (обычно сахароза или глюкоза), витамины, регуляторы роста. Иногда в состав питательных сред включают комплексные органические добавки (гидролизат казеина или смесь аминокислот, дрожжевой экстракт, экстракты из разных органов растения).

При культивировании каллусных тканей применяются среды Мурасиге-Скуга, Гамборга, Нагата-Такебе, Хеллера, Нича-Нича, Шенка и Хильдебранта, Кнудсона и другие в различных модификациях.

### Основные характеристики каллусных культур

Каллусные клетки *in vitro* сохраняют многие физиолого-биохимические свойства нормальных клеток. Каллусные клетки сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов. Морозостойкость и способность к закаливанию присущи каллусным клеткам, полученным из морозостойких растений.

Общим у каллусных и пористых клеток является устойчивость к действию высоких температур, осмотически активных веществ, засолению.

Каллусные клетки обладают отдельными свойствами, отличающими их от нормальных. В них появляются специфические белки и уменьшается количество белков, характерных для фотосинтезирующих клеток листьев, или они совсем исчезают. Каллусные клетки отличаются большой генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью.

В результате выхода из-под контроля организма рост каллусных клеток происходит неорганизованно, асинхронно и является неограниченным. При пересадках на свежую питательную среду культура каллусной ткани моркови, полученная Р. Готре более 60 лет назад, до сих пор растет в коллекции.

Клеточный цикл у каллусных клеток более длителен, чем у растений, произрастающих в открытом грунте.

Основной важнейшей особенностью популяции соматических клеток является нестабильность генома клеток и их *генетическая гетерогенность* – появление в процессе культивирования полиплоидных, анеуплоидных клеток, клеток с хромосомными абберациями и генными мутациями.

#### *Причины генетической гетерогенности:*

1. Генетическая гетерогенность исходного материала.
2. Нарушение коррелятивных связей при выделении экспланта.

3. Действие компонентов среды. Ауксины, особенно 2,4-Д – мутагены, цитокинины способствуют полиплоидизации.

4. Длительное субкультивирование, при котором накапливаются генетически измененные каллусные клетки.

Генетическую гетерогенность клеток любой популяции не следует рассматривать как недостаток, более того, это, как правило, необходимое условие ее существования, основа адаптационных возможностей популяции.

Одной из особенностей каллусной культуры является *физиологическая асинхронность* – в каждый момент времени клетки находятся в разных фазах роста: одни делятся, другие растут, а третьи уже стареют.

#### *Причины возникающей асинхронности:*

1. Особенности вида, сорта, генотипа растения, особенности экспланта.
2. Стрессы культивирования (неоптимальная среда).
3. Изменение баланса эндогенных гормонов и концентрации в среде экзогенных гормонов в процессе выращивания.
4. Генетическая гетерогенность клеток и клонов.
5. Аномалии митотического цикла клеток *in vitro*.
6. Физические факторы (температура, свет, аэрация).

К настоящему времени разработаны различные методы синхронизации клеток. Обычно для этого используют приемы, останавливающие клеточный цикл на границе его фаз. Например:

1) двукратное исключение из среды фосфора (в начале эксперимента и после определенного интервала времени);

2) введение в питательную среду 5-аминоурацила, который задерживает клетки на границе G1/S цикла, но и после удаления ингибитора деление клеток не начинается, пока в питательную среду не внесли фитогормоны;

3) использование 5-метилоксимочевины, которое наиболее удачно, данный подход позволяет накопить более 80% клеток на G1/S фазе клеточного цикла.

Следует отметить, что синхронизировать популяцию можно лишь на небольшой промежуток времени. Через 3–4 недели, если не принимать специальных мер, популяция вновь становится асинхронной.

Неорганизованно растущие каллусные клетки, благодаря процессам вторичной дифференцировки могут образовывать ткани (гистогенез), органы (органогенез) и зародышеподобные структуры – эмбриониды (эмбриоидогенез, или соматический эмбриогенез), см. рис. 75.

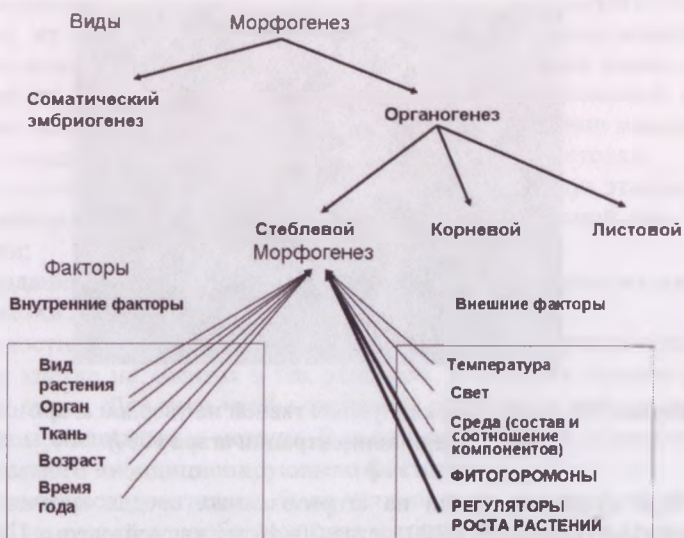


Рисунок 75 – Виды морфогенеза *in vitro* и влияющие на него факторы

Факторы, влияющие на морфогенез каллусной ткани:

- 1) физиологические (генотип, возраст растения-донора, возраст первичного экспланта, тип первичного экспланта, сезонность изоляции);
- 2) минеральный состав питательной среды (соотношение и концентрации минеральных солей, концентрация сахарозы);
- 3) баланс экзогенных и нативных гормонов (соотношение цитокининов и ауксинов);
- 4) физические (рН среды, фотопериод, температура, интенсивность освещения, спектральный состав света);
- 5) число субкультивирований.

**Методы выращивания культуры каллусных тканей**  
**Поверхностное культивирование**

Культура каллусных тканей выращивается поверхностным способом на агаризованной среде с концентрацией агар-агара 0,6–1% (рис. 76), на среде с применением других желирующих полимеров либо на мостиках из фильтровальной бумаги или дисках из пенополиуретана, погруженных в жидкую питательную среду.



**Рисунок 76** – Культура каллусных тканей на твердой агаризованной среде (при концентрации агара 10%)

При культивировании на агаризованных средах кусочек каллуса должен иметь массу 60–100 мг на 30–40 мл свежей среды. Первичный каллус, возникший на эксплантах через 4–6 недель (в зависимости от скорости роста клеток), для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и дальнейшему росту, а также отмирания каллусных клеток, переносится на свежую питательную среду (пассируется или субкультивируется). Размер транспланта (переносимого фрагмента) при культивировании на агаризованной питательной среде обычно составляет от 60 до 100 мг массы ткани на 30–40 мл питательной среды.

### **Культивирование отдельных клеток**

Отдельные клетки культивируют для получения клонов, изучения их генетической и физиологической изменчивости или стабильности. Кроме того, отдельные клетки могут служить моделью для сравнительного изучения физиологических процессов в ткани и изолированной клетке. Например, для изучения фотодыхания можно сравнивать процесс фотосинтеза на уровне отдельных клеток мезофилла листа и целой ткани.

Отдельные клетки также важны для клоновой селекции мутантных, гибридных и трансформированных линий. Обычно в такие клетки вводят маркерные гены, которые позволяют осуществлять селекцию. Так, например, вопрос о генетической неоднородности легче решать, используя клон – потомство одной клетки, а не гетерогенную ткань исходного экспланта.

Для выделения одиночных клеток используют низкоагрегированные суспензии, из которых отбирают отдельные клеточки. Изолирование клеток также можно производить непосредственно из тканей целого растения после их предварительной мацерации. Однако идеальный способ получения одиночных клеток заключается в использовании изолированных протопластов после восстановления ими клеточной стенки.

Выращивание одиночных клеток складывается из двух этапов:

1) изолирование неповрежденной клетки растительной или каллусной ткани;

2) создание условий, благоприятных для роста и развития изолированной клетки.

Трудности культивирования одиночных клеток связаны с тем, что отдельная клетка не делится в тех условиях, в которых хорошо растет каллусная ткань. Для того чтобы заставить одиночные клетки делиться, разработаны специальные методы. Все они основаны на использовании так называемого «кондиционирующего фактора».

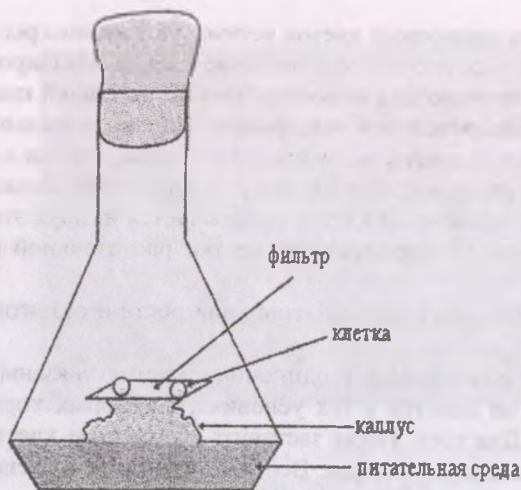
Многими исследователями было установлено, что активно делящиеся клетки не только адсорбируют питательные вещества из среды, но и каким-то образом изменяют, «кондиционируют» ее, выделяя продукты собственной биосинтетической деятельности, способствующие росту одиночных клеток. Отдельная клетка должна получить сигнал в виде фактора кондиционирования от соседних клеток, и только тогда деление индивидуальной клетки становится возможным. Этой цели служат следующие методы:

1. Метод «ткани-няньки» – кондиционирующий фактор выделяется находящимися рядом с одиночной клеткой кусочками ткани-«няньки».

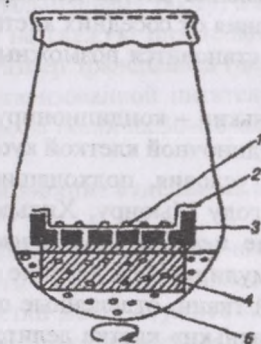
Впервые подобрать условия, подходящие для деления отдельных клеток, удалось в 1954 году Мьюиру, Хильденбранту и Райкеру. Этот способ получил название *метода «ткани-няньки»* (рис. 77). При этом функцию «няньки», стимулирующей деление одиночной клетки, выполняют кусочки каллусной ткани, отделенные от нее фильтровальной бумагой. В присутствии «няньки» клетка делится и дает индивидуальную колонию клеток – клонов.

2. Метод «кормящего слоя» – кондиционирующий фактор выделяют активно делящиеся клетки суспензионной культуры того же вида растений, что и одиночная клетка (рис. 78). Для этого берут суспензию клеток того же вида, что и одиночная клетка, или близкого вида. Клеточная суспензия должна находиться в ранней экспоненциальной фазе ростового цикла.

3. Кондиционирование среды путем добавления питательной среды от интенсивно делящейся культуры клеток.



**Рисунок 77 – Схема использования каллуса в качестве «ткани-няньки»**



**Рисунок 78 – Использование «кормящего слоя»: (сuspensionная культура) при выращивании колоний из отдельных клеток кукурузы или протопластов (схема):**

- 1 – колония, возникшая из отдельной клетки, 2 – фильтровальная бумага, 3 – металлическая сетка, 4 – подложка (пенополиуретан), 5 – суспензия клеток «кормящего слоя».

Эти способы культивирования позволяют клетке «ощущать» фактор кондиционирования. Он либо вырабатывается в достаточном количестве клетками «кормящего слоя», «ткани-няньки», либо содержится в суспензии, где ранее культивировались клетки, либо не теряется в большом объеме среды. Фактор, вызывающий деление клеток, вырабатывается самими клетками, но в небольшом количестве. Согласно исследованиям А. И. Павловой и Р. Г. Бутенко, этот фактор водорастворим, термостабилен, не заменяется фитогормонами, включает низкомолекулярные вещества, вещество стабильно при рН 4–11, молекулярная масса примерно 700Д, является синергистом брассиностероида. То есть это не чистое вещество, а сумма факторов, которые выделяются самой клеткой.

4. Метод культивирования одиночных клеток *в микрокапле*, т. е. очень малом объеме (~20 мкл) богатой, оптимально сбалансированной по составу питательной среды. Метод микрокамеры был разработан Джонсоном в 1960 г., и может быть использован при оптимальной сбалансированности состава питательной среды для культивирования отдельно клетки. Метод включает следующие процедуры: на предметное стекло с помощью жидкого парафина на небольшом расстоянии наклеивают покровные стекла; между которыми наносят квадрат жидкого парафина; в камеру из парафина помещают каплю питательной среды с отдельной клеткой; сверху камеру накрывают еще одним покровным стеклом; за развитием клеточной колонии наблюдают под микроскопом. Использование микрокамеры Джонса позволило Вэлису и Хильдебрандту в 1965 г. продемонстрировать возможность получения из изолированной клетки табака нормально развивающегося и достигшего цветения растения. Таким образом, впервые экспериментально была доказана тотипотентность клетки растения.

### Культура протопластов

Протопласт – клетка без клеточной стенки. Протопласты получают путем удаления клеточной стенки растений ферментами (пектиназой и целлюлазой).

При определенных условиях протопласты могут сливаться, объединяя, таким образом, два генома в одном. Если у одной из клеток удалить ядро, то могут получиться гибриды, содержащие ядро одного вида растения и цитоплазму и органеллы (кроме ядра) другого вида растения. Такая система позволяет получить отдаленные гибриды (межвидовые и межродовые).

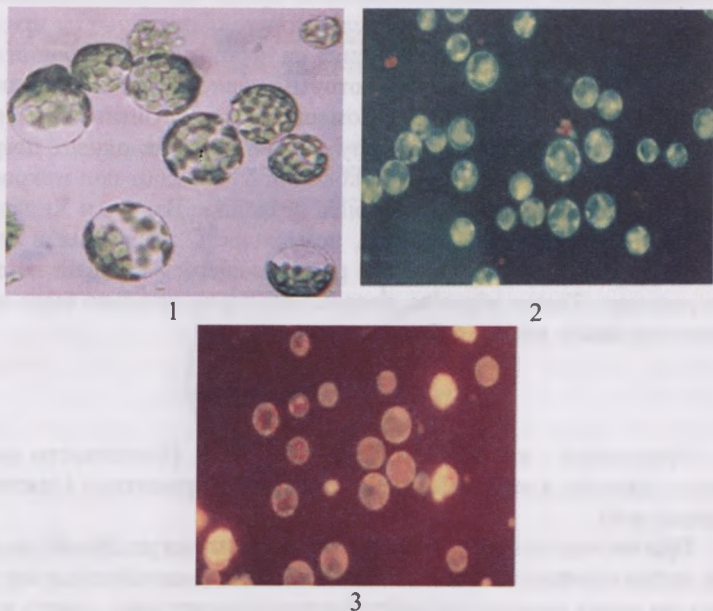
Протопласты растений представляют собой отправную точку многих методик, используемых для генетической модификаций целых рас-

тений и их клеток. Изолированные протопласты применяют для: слияния, с целью получения генетически измененных растений; введения в протопласты чужеродной ДНК (трансгенез); трансформации – включения органелл, липосом, различных молекул и т.п.

Протопласты являются уникальной моделью для изучения фундаментальных физиологических проблем у растений: изучение химии и структуры клеточной стенки (и при разрушении, и при синтезе «*de novo*»); изучение свойств плазмалеммы, трансмембранных перемещений; наблюдение за закономерностями дифференцировки клеток при слиянии протопластов, отслеживание взаимодействия ядра и цитоплазмы в полученной гибридной клетке, изучение соматических гибридов.

Источниками получения протопластов служат изолированные органы

растений и их части (листья, семядоли, корни, гипокотили, лепестки, пыльцевые зерна), суспензионные культуры и каллусная ткань (рис. 79).



**Рисунок 79** – Изолированные протопласты:

1 – из мезофилла листа картофеля; 2 – листа томата;

3 – протопласты из каллуса пшеницы

## Способы получения протопластов

Процедура получения протопластов состоит из 3 этапов: обработка ферментами; выделение протопластов из клеточных стенок; отделение интактных протопластов от клеточных осколков.

Впервые протопласты в 1892 г. выделил Дж. Клеркер, который использовал механический способ. При этом способе добываются плазмолита растительных тканей, например, с помощью 0,1 % раствора сахарозы с последующим разрезанием эпидермиса и освобождением протопластов в окружающую питательную среду. Недостатками метода являются: невысокая производительность, можно использовать только ткани с экстенсивным плазмолизом, трудоемкость и длительность.

Другой метод выделения протопластов энзиматический, с использованием ферментов. В 1960 году Коккинг обработал кончики корней томата гидролитическим ферментом из культуральной жидкости плесневых грибов (*Myrothecium verrucaria*) и впервые получил изолированные протопласты высших растений энзиматическим способом.

Преимущества энзиматического метода: одновременно выделяется большое количество протопластов (до 10 млн из грамма ткани или клеток), клетки не подвергаются сильному осмотическому стрессу, клетки не повреждаются, метод сравнительно быстрый.

При выделении протопластов из листьев сначала удаляют эпидермис, лист нарезают на сегменты, а затем подвергают энзиматической обработке. Получение протопластов из каллусных или суспензионных культур осуществляется по той же схеме (рис. 80). Однако в этом случае нет необходимости в стерилизации исходного материала. Хорошим выходом считается получение  $1 \cdot 10^6$ – $5 \cdot 10^6$  жизнеспособных протопластов на 1 г свежей массы ткани растения или культивируемых клеток.

Для предотвращения разрушения протопластов, после удаления клеточных стенок, в среду вводят осмотически активные вещества, так называемые стабилизаторы. Это могут быть: растворы неорганических солей ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaHPO}_4$ ); органических гликолей (маннита, сорбита); моно- и дисахаридов (глюкозы, ксилозы, сахарозы). Концентрация осмотиков в среде колеблется от 0,3–0,8 моль/л, рН = 5,4–6,2. Однако применительно к виду растения, из которого получают протопласты, необходимо подбирать индивидуальные условия для «протопластирования» (осмотический стабилизатор, рН среды, ГС). Длительность инкубирования растительного материала в среде с ферментами сильно варьирует и составляет от 3–4 до 16–18 часов.

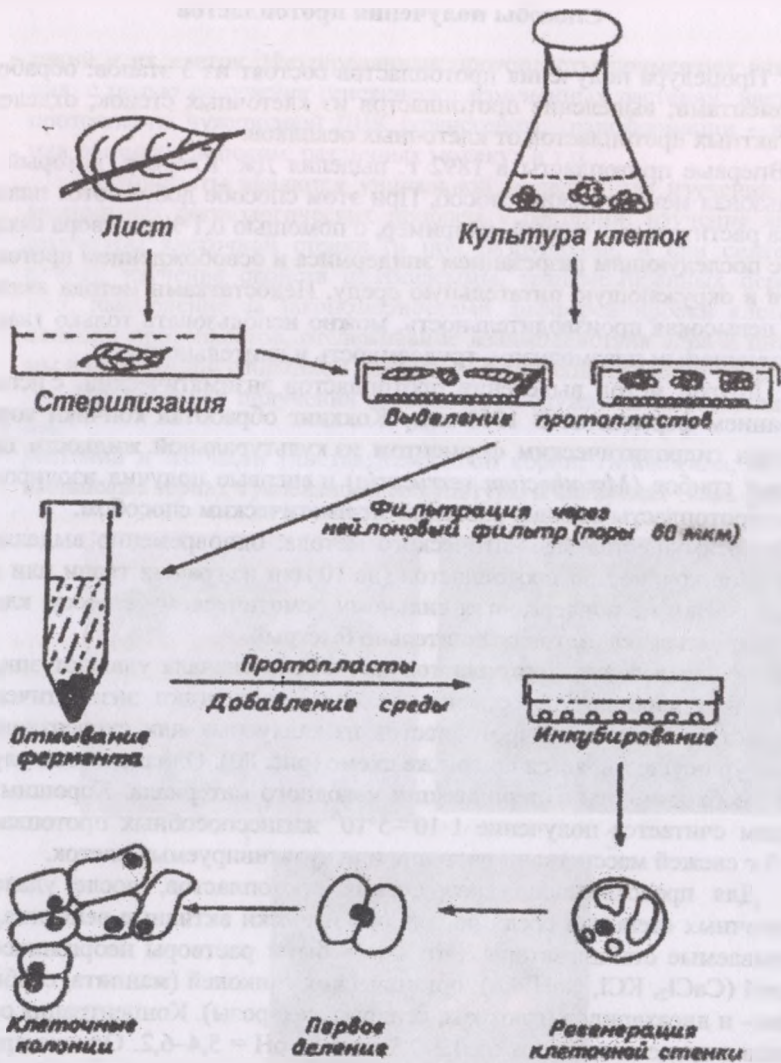


Рисунок 80 – Схема выделения и культивирования протопластов из листьев

Для удаления клеточной стенки используют ферменты трех типов: целлюлазы (Onozyka R-10, Cellulysin, Driselase), гемицеллюлазы (Rhozyme HP150, Hemicellulase), пектиназы (Macerozyme R-10, Macerase, Pectinol AC, Pectolyase Y23, Pektinase, PATE); отечественные препараты – 3С целлоксандин и ксиланаза, которая является целлюлозно-пектиновым комплексом.

Все ферментные растворы стерилизуют фильтрованием через бактериальные фильтры. Комбинация ферментов и их соотношение специфично для каждого типа клеток. Например, для получения протопластов из листьев *Nicotiana tabacum* листовую ткань без эпидермиса погружают в смесь ферментов, включающую 0,5% пектиназы и 2 % целлюлазы в 0,7 М растворе маннита или сорбита; для получения протопластов из листьев клевера и люцерны используют 2–5 % смесь гликаназ с пептидазами, и т. д.

### Способы культивирования протопластов

*Метод жидких капель:* Суспензию протопластов в виде капель помещают на пластиковые чашки Петри. Вариацией этого способа является культивирование единичных изолированных протопластов в микрокаплях объемом 1 мкл, предложенное Ю. Глебой в 1978 г. Методы культивирования единичных протопластов и клеток растений в микрокаплях питательной среды применяются для слияния индивидуальных растительных протопластов и получение растений из единичных продуктов слияния (рис. 81).



**Рисунок 81** – Метод жидких капель, используемый при культивировании одиночных протопластов

*Культивирование протопластов в жидкой среде.* Для успешного культивирования протопластов в жидкой среде, так же, как и изолированных клеток, требуется высокая плотность. В большинстве случаев эта величина составляет  $10^4$ – $10^5$  клеток/мл, а объем культуры 2,5–10 мл.

*Метод платирования в агаре.* Суспензию протопластов наливают в пластиковые чашки Петри, добавляют равный объем той же среды с 1 % агаром при температуре не выше 45°C. После остывания чашки Петри переворачивают и культивируют при 28°C. В данном случае протопласты фиксированы в одном положении и физически отделены друг от друга. Это дает возможность наблюдать за развитием интактного протопласта: формированием клеточной стенки, делением, ростом и развитием растения. Вариантом этой техники является использование кормящих протопластов или клеток, подвергнутых воздействию рентгеновского или  $\gamma$ -излучения, что блокирует их способность к делению. Такие протопласты или клетки смешивают с жизнеспособными протопластами, и они поддерживают и стимулируют их рост.

По питательным потребностям изолированные протопласты сходны с целыми клетками. Поэтому питательные среды, применяемые для их культивирования, подобны таковым для клеточных культур. Чаще всего используют среды Мурасиге и Скуга, Нагата и Такебе, Гамборга В5, Као и Михайлюка. Существенным их отличием является увеличение в 2–4 раза концентрации кальция и присутствие осмотиков.

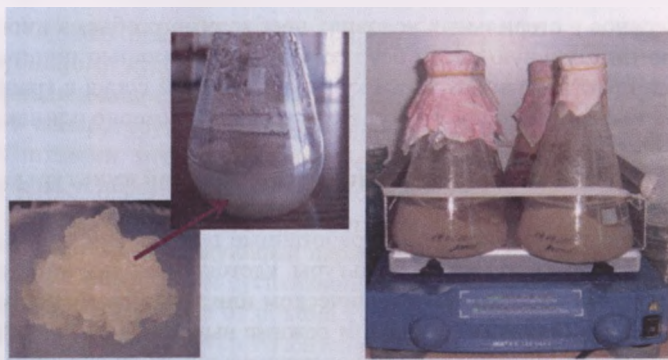
Температура, при которой культивируются протопласты, варьирует в значительной степени в зависимости от специфики вида. Например, для пшеницы это 22°C, для другого представителя злаковых – росички кроваво-красной – 30°C. Обычно протопласты не выдерживают даже незначительного отклонения от оптимальной температуры.

Свет высокой интенсивности губительно действует на свежие выделенные протопласты. Оптимальные значения освещенности варьируют в широких пределах. Например, протопласты люцерны образуют колонии в абсолютной темноте, а протопласты немезии оптимально растут при освещенности 80000 лк.

В процессе культивирования интактные протопласты регенерируют новую клеточную стенку и превращаются в клетки, способные делиться и давать начало каллусной ткани. Дальнейшая задача – получение из каллусной ткани растений-регенерантов.

### Суспензионные культуры

Культуры клеток растений, выращиваемые в жидкой питательной среде, обычно называют суспензионными культурами. Отдельные клетки, небольшие группы или достаточно крупные агрегаты (более 50 клеток) выращивают во взвешенном состоянии в жидкой среде. Применяют различные аппараты и способы поддержания их в таком состоянии (рис. 82).



**Рисунок 82 – Получение и культивирование суспензионной культуры**

Выращивание клеточных суспензий в жидкой питательной среде имеет ряд преимуществ перед выращиванием каллусных тканей поверхностным способом. Эти культуры представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, поэтому можно получать хорошо воспроизводимые результаты по влиянию экзогенных факторов на метаболизм и рост клеточных популяций.

Суспензионную культуру можно получить из фрагментов органа растения (диски запасающей паренхимы мясистых корней моркови, петрушки, клубней картофеля и др.), однако этот путь более трудосемкий и требует большего времени. Клетки экспланта должны при этом образовать первичный каллус, и только после этого поверхностные каллусные клетки, попавшие в жидкую среду и размножившиеся в ней, дадут начало линии, способной расти в суспензии.

Большинство суспензионных культур можно получить путем переноса рыхлого каллуса в перемешиваемую жидкую среду того же состава, что и среда, на которой выращивался каллус. Рыхлые, оводненные культуры каллусных тканей более пригодны для перевода в суспензию, чем структурированные, плотные каллусы. Первичную суспензию перед субкультивированием фильтруют через сито из нержавеющей стали, чтобы избавиться от крупных, плотных кусков каллусной ткани, остатков экспланта и очень крупных агрегатов клеток. Фильтрация рекомендуется и в нескольких последующих субкультивированиях до приобретения клеточной суспензией желательных характеристик. Однако агрегированность суспензий зависит не только от характеристик начальной линии, но и от условий культивирования.

Перенос в стерильных условиях необходимого объема инокулята на свежую питательную среду осуществляется с помощью пипеток, шприцов или просто переноса части культуры в новый сосуд с градуировкой объема так, чтобы объем инокулята оставался примерно одинаков.

### Способы выращивания суспензионной культуры

Способы выращивания, разработанные в микробиологии, применяются и для суспензионной культуры клеток. Используются закрытые или открытые системы в периодическом или проточном режимах. В закрытой системе при непрерывном режиме выращивания клеточная масса (инокулюм) помещается в определенный объем среды. До конца выращивания система остается закрытой по всем параметрам, кроме газа. В закрытой периодической культуре в систему через определенные промежутки времени подается свежая питательная среда, а старая удаляется в том же объеме. Клетки при этом остаются в системе в течение всего цикла выращивания.

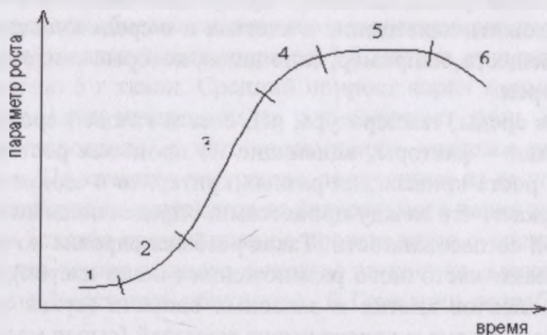
В открытые проточные культуры свежая питательная среда поступает также периодически, однако отбирается не только старая среда, но и часть урожая клеточной массы. Регуляция этого процесса может осуществляться по принципу турбидостата или хемостата. В турбидостате подача свежей среды и отбор суспензии происходит после достижения клеточной популяцией определенной плотности клеток. В хемостате скорость протока задается экспериментатором и от нее зависит скорость роста клеточной массы. Для этого питательная среда лимитируется по одному из наиболее важных для роста факторов, чаще всего по фосфору, азоту или сахару. Режим хемостата позволяет с помощью фиксированной скорости разбавления поддерживать константную скорость деления и плотность клеток в популяции. При глубинном выращивании растительных клеток принцип турбидостата практически не применяется. Одной из причин этого является разрушение части клеток при отводе их к оптическому прибору.

Выращивание суспензии клеток растений в установках непрерывного культивирования по принципу хемостата применяется как для изучения метаболизма клеток, стабильно поддерживаемых на разных фазах клеточного цикла, так и при промышленном выращивании клеточной биомассы с целью получения экономически важных продуктов. В Японии использовали ферментер объемом 2000 л для непрерывного культивирования в течение 3-х месяцев клеток табака по принципу хемостата. Продуктивность была очень высокой и составила 5,58 г/л в сутки сухой массы клеток.

Однако пока наиболее изученным и распространенным режимом глубинного культивирования клеточной суспензии является закрытая периодическая система. В этом случае для аэрации используют различную аппаратуру: роллеры, качалки, ферментеры с механическими или магнитными мешалками или ферментеры барботажного типа, где и аэрация, и перемешивание осуществляются воздушным потоком.

Рост суспензионных культур клеток можно оценивать по одному или нескольким следующим параметрам: 1) объему осажденных клеток (определенный объем суспензионной культуры центрифугируют и определяют объем осадка от объема суспензии); 2) числу клеток (можно посчитать в камере Фукса-Розенталя); 3) сырой и сухой массе (фильтруют под вакуумом суспензию клеток через предварительно взвешенную и смоченную нейлоновую ткань или фильтровальную бумагу, промывают клетки и взвешивают вместе с фильтром; для определения сухой массы клетки вместе с фильтром высушивают при 105°C до постоянного веса); 4) содержанию белка или ДНК (собирают клетки на фильтре из стекловаты, промывают, затем определяют белок по Лоури или ДНК по Волгину); 5) жизнеспособности клеток (движению цитоплазмы, интактному ядру или с использованием прижизненных красителей, которые не проникают в интактные живые клетки, а только в клетки с поврежденной плазмалеммой).

Основными критериями роста в цикле выращивания служит увеличение числа клеток, их сырой и сухой массы. Ростовая кривая имеет S-образную форму (рис. 83).



**Рисунок 83** — Модельная кривая роста суспензионной культуры.

Фазы ростовой кривой:

1 — лаг-фаза, 2 — экспоненциальная фаза, 3 — фаза линейного роста, 4 — фаза замедленного роста, 5 — стационарная фаза, 6 — деградация и смерть клеток

На ней различают латентную (лаг) фазу, в которой видимый рост инокулюма не наблюдается ни по одному из критериев (1); экспоненциальную фазу, характеризующуюся ростом с ускорением (2); линейную, в которой скорость роста постоянна (3); фазу замедленного роста (4); стационарную фазу (5) и фазу деградации клеток (6).

Гибель популяции клеток может происходить по разным причинам: 1) случайная гибель (заражение фитовирусами, бактериями); 2) из-за преждевременного изнашивания клетки в результате неоптимальных условий выращивания; 3) смерть в результате нормальных процессов развития и старения (генетический счетчик, программируемая клеточная смерть).

Форма реальных ростовых кривых может значительно отличаться продолжительностью фаз от модельной. Это зависит как от генетической характеристики вида, так и от условий выращивания, количества инокулюма. Было показано, что популяция диоскорей быстро достигала фазы экспоненциального роста и, не переходя в фазу стационара, клетки деградировали и погибали. Популяция табака характеризовалась большей длительностью фазы стационара (до 60 дней). В период от 60 до 70 дней клетки были живыми, но при высеве их в качестве инокулюма не размножались и погибали на 80-й день. Можно полагать, что в приведенном примере клетки табака оказались значительно выносливее к стрессу, создаваемому условиями культивирования, имели более высокий биосинтетический потенциал, но существовала лимитация по питанию в периодическом режиме выращивания. В случае диоскорей, клетки которой еще до фазы стационара прекращали деление и погибали, можно предположить накопление в клетках и в среде культивирования токсических веществ, например, сапонинов, которые синтезируются в клетках диоскорей.

Состав среды, температура, рН, состав газовой среды, скорость перемешивания – факторы, влияющие на процессы ростового цикла. Из сравнения роста кривых для разных критериев в одном цикле выращивания вытекает, что между процессами, определяющими эти показатели, нет строгой согласованности. Такая разбалансировка по скоростям между процессами клеточного размножения (число клеток), синтеза структурных элементов клетки и запасных веществ (сухая масса), а также увеличением объема и содержимого вакуолей (сырая масса) отражает не только специфику онтогенеза клетки высшего растения, но и асинхронность популяции по времени перехода клеток из одной фазы в другую.

## Области использования суспензионных культур

В культуре клеток обнаружены традиционные для растений вещества вторичного метаболизма, а также выявлены новые необычные соединения: алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, натуральные красители (пигменты), кампотедин, харрингтонин и другие антиканцерогены, пептиды (ингибитор протеаз, ингибитор фитовирусов). В этой связи суспензионные культуры наиболее часто используют для промышленного получения вторичных метаболитов.

Культивируемые в суспензии клетки могут применяться также как мультиферментные системы, способные к широкому спектру биотрансформаций химических веществ (реакции окисления, восстановления, гидроксилирования, метилирования, гликозилирования, этерификации, изомеризации). Использование активных ферментов культивируемых клеток растений важно для получения более ценного продукта из натурального или синтетического предшественника. Возможно также применять биотрансформацию для создания уникальных биологически активных продуктов на основе синтетических соединений или веществ промежуточного обмена растений других видов.

В культуре клеток могут синтезироваться специфические для высших растений экономически важные соединения: алкалоиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, терпеноиды и терпены, эфирные масла, стероиды, пряности, инсектициды, натуральные красители и многие другие ценные вещества. Так у нас в стране налажено промышленное производство биомассы ценного лекарственного растения женьшеня. Из 0,1 г экспланта женьшеня за 1,5 месяца культивирования *in vitro* получают до 5 г ткани. Средний прирост корня женьшеня в оптимальных условиях на плантациях за год достигает лишь 8 г. Следовательно, культивирование *in vitro*, несомненно, является рентабельным производством. По качеству экстракты, полученные из каллусной ткани, почти не отличаются от экстрактов из натурального корня женьшеня.

В Японии ведется промышленное производство суспензии воробейника-продуцента лекарственного вещества шикониина, а также суспензии табака с целью получения убихинона. В Германии разработан способ получения алкалоидов N-метилтриптомина и горденина из суспензионной культуры ячменя.

Для повышения эффективности синтеза вторичных соединений используют химический и радиационный мутагенез, что приводит к возникновению наследственных изменений в клетках. Например, в Институте физиологии растений РАН получены мутантные клеточные линии

раувольфии змеиной, которые приобрели способность продуцировать в 10 раз больше ценного для медицины антиаритмического алкалоида аймалина, по сравнению с исходными клетками. Получены высокоэффективные штаммы клеток руты душистой, синтезирующих алкалоид рутаридон, штаммы диоскорей дельтовидной, продуцирующей диосгенин, который необходим для синтеза гормональных препаратов.

В литературе имеются данные по биотрансформации химических соединений растительными клетками *in vitro*. Так, например, если в суспензионную культуру лекарственного растения *Digitalis lanata* (наперстянки шерстистой) добавить гликозид дигитоксин, то клетки способны преобразовать его в дигоксин – более ценный для медицины продукт (рис. 84). Возможна биоконверсия морфина в суспензионной культуре клеток гинго в два новых алкалоида, одним из которых является кодеин.

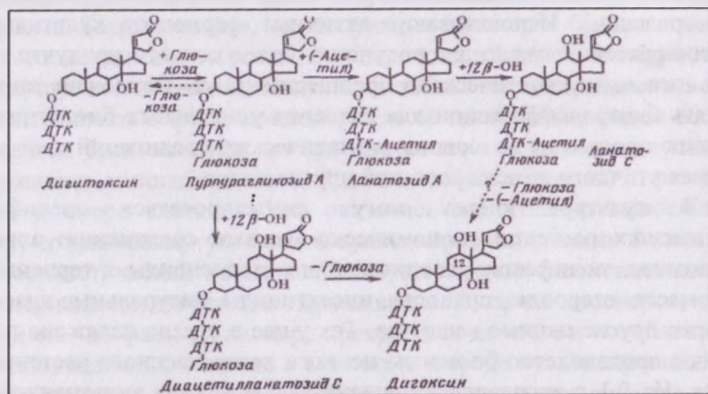


Рисунок 84 – Биотрансформация дигитоксина в культурах клеток *Digitalis*

Сейчас в разных странах в культуре выращивают более полусотни различных видов растений, среди которых агава, белладонна, ландыш майский, дурман обыкновенный, наперстянка душистая, диоскорей дельтовидная, женьшень, табак, раувольфия, змеиная, клещевина, катаранус розовый. Отметим, что гликозиды, полученные в пробирочной культуре, более активны, чем гликозиды из надземных частей обычных растений. Промышленное выращивание суспензионных культур перспективно не только для получения веществ, синтезируемых растениями, но и для поиска новых продуктов синтеза с принципиально иным типом действия, чем уже известные продукты растений.

## Области использования культуры растительных клеток и тканей в биотехнологии

Применение культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии растений следует рассматривать в трех направлениях.

**Первое** направление – использование изолированных клеток и тканей в селекции растений *in vitro* на устойчивость к различным неблагоприятным факторам среды: засухе, засолению, низким и высоким температурам, фитопатогенам, тяжелым металлам и др. Также это направление занимается исследованиями соматической гибридизации и созданием трансгенных растений (основные методы). К вспомогательным методам данного направления относится оплодотворение в условиях *in vitro*, культура изолированных зародышей, клональное микроразмножение, получение гаплоидных растений.

**Второе** направление – использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала (клональное микроразмножение). Этот метод позволяет получать из одной меристемы сотни тысяч растений в год. Получением такого здорового посадочного материала этим методом в нашей стране успешно занимается ряд учреждений. Уже имеется более 20 сортов картофеля, ряд ценных сортов садовой земляники, малины, некоторых декоративных растений, лишенных вирусных частиц.

За последнее десятилетие технология клонального микроразмножения становится коммерческим производством. Наибольшее распространение этот метод получил при культивировании декоративных, тропических и цветочных растений, а для также земляники, некоторых подвоев яблони и персика оно начинает заменять традиционные способы размножения и селекции.

**Третье** направление – использование изолированных растительных клеток для производства веществ вторичного синтеза: алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла, флавоноиды с целью их использования в медицине, парфюмерии, косметики и других отраслей промышленности. Как правило, вторичные вещества получают из каллусной ткани, культивируемой на твердой (агаризованной) или жидкой (суспензионная культура) питательной среде. На основе клеточных технологий получают такие медицинские препараты, как диосгенин из клеток диоскореи дельтовидной, аймолин из клеток рауфольфии змеиной, тонизирующие вещества из клеток женьшеня, используемые в медицине парфюмерии. Преимуществом такого способа получения веществ вторичного синтеза является также возможность использовать для этой

цели растения, не произрастающие в наших природных условиях, и получать продукцию круглый год.

Весьма многообещающим представляется применение методов культуры тканей для преодоления трудностей, стоящих перед генетиками и селекционерами при выведении новых, более продуктивных и более устойчивых сортов сельскохозяйственных растений. Известный уже ряд лет способ выращивания на питательных средах гибридных зародышей должен быть дополнен способами получения гибридных проростков от скрещивания несовместимых в естественных условиях родительских пар. Наибольшую ценность для генетико-селекционных целей представляют разработанные в последнее время методы получения гаплоидных растений в культуре пыльцы и гибридизации соматических клеток.

### Контрольные вопросы:

- 1 Назовите способы культивирования каллусов.
- 2 Чем характеризуются основные фазы ростового цикла каллуса?
- 3 Отличаются ли по морфологии каллусы различных видов растений?
- 4 Для каких целей используют культуру каллусов в биотехнологии, генетике и селекции?
- 5 Какие питательные среды используют для индукции каллусогенеза и культивирования каллусов?
- 6 Какими методами можно получить протопласты у растений?
- 7 Способы культивирования протопластов.
- 8 Что такое суспензионные культуры? Каковы основные способы их получения?
- 9 Перечислите основные направления использования культуры клеток растений в биотехнологии растений.

## ТЕМА 11. КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

### История культивирования животных тканей

Первые опыты по культуре животных тканей были проведены немецким биологом В. Ру, которому удалось в 1885 г. в течение нескольких дней поддерживать развитие нервной пластинки куриного эмбриона в теплом солевом растворе. Позднее, в 1897 г., Лёб (Loeb) поддерживал в жизнеспособном состоянии клетки крови и соединительной ткани в пробирках с сывороткой и плазмой крови. Льюнгрен (1898) показал возможность поддержания эксплантатов кожи человека в жизнеспособном состоянии в кислой среде с сохранением способности к реимплантации. Дополнительные эксперименты были проведены Джолли (1903), наблюдавшим деление клетки в висячей капле, содержащей лейкоциты саламандры, а Биб и Эвинг (1906) подтвердили это при пересадке лимфосаркомной ткани собаки.

Основой для дальнейшего развития метода культивирования животных клеток вне организма послужила предложенная американским биологом Р. Гаррисоном в 1907 г. воспроизводимая техника культивирования в сгустках лимфы небольших кусочков нервной трубки эмбриона лягушки, где Гаррисон через несколько недель наблюдал образование нервных волокон. Французский хирург и патофизиолог А. Каррель, сумевший в течение 34 лет сохранять у штамма клеток сердца куриного эмбриона способность к активным делениям, доказал, что животные клетки могут неограниченно долго расти в культуре *in vitro*.

Первые суспензионные культуры клеток злокачественных тканей были получены в 1953 г. Оуенсом и сотрудниками. Это клетки HeLa, выделенные из раковой опухоли шейки матки человека (рис. 85).

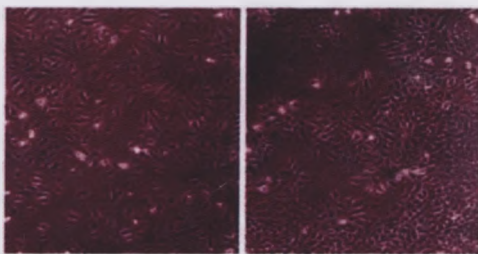


Рисунок 85 – Клетки HeLa

Перевиваемая линия клеток карциномы шейки матки была выделена еще в 1952 г. Джемом с сотрудниками и используется в настоящее время во многих лабораториях мира. Игл (1955) систематически исследовал пищевые потребности клеток человека и мыши в условиях *in vitro*. До

тех пор, пока в 1961 г. Хейфлик и Мурхед не выделили линию диплоидных клеток человека (HDC) WI-38, считалось, что один раз установившаяся клеточная линия имеет неограниченное время жизни. Относительно линии WI-38 было показано, что период ее существования в культуре ограничивается приблизительно 50 генерациями.

Последующий этап в истории культивирования диплоидных клеток человека связан с установлением факта, что они являются генетически стабильными и свободными от всех известных латентных и онкогенных вирусов. Поэтому линии диплоидных клеток человека разрешено применять для получения продуктов, предназначенных для людей.

Предположение о том, что соматические клетки могут сливаться друг с другом, было высказано еще в начале XIX века в связи с открытием многоядерных клеток. Однако гибриды соматических клеток были открыты лишь в 60-х годах нашего столетия. В 1960 г. Барский с сотрудниками сообщили о выделении линии гибридных клеток. Гибридные клетки были получены путем смешения двух линий, выделенных ранее из 1 клетки мышинной саркомы.

В 1976 году Келлер и Мильштейн детально описали метод слияния клеток секретирующих антител какой-то одной специфичности, с клетками непрерывно растущей миселомы.

Первое сообщение о трансплантации эмбрионов было сделано в 1890 году, когда Хип получил потомство от крольчихи в результате пересадки оплодотворенных яйцеклеток. В 1949 году была проведена пересадка эмбрионов овцам и козам.

Впервые трансплантацию ядер соматических клеток зародышей в энуклеированные клетки лягушки осуществили американские исследователи Р. Бриггс и Т. Кинг в 1952 году. Ученые, пользуясь микропипеткой, удаляли ядра из яйцеклеток шпорцевой лягушки, а вместо них пересаживали ядра клеток эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития.

Более широкие исследования, охватывающие не только амфибий, но и рыб, а также дрозофил, в 1962 г. были начаты английским биологом Дж. Гордоном. Он первым в опытах с южноафриканскими жабами *Xenopus laevis*) в качестве донора ядер использовал не зародышевые клетки, а уже вполне специализировавшиеся клетки эпителия кишечника плавающего головастика.

Гордон вместе с Ласки (1970) стали культивировать *in vitro* клетки почки, легкого и кожи взрослых животных и использовать уже эти клетки в качестве доноров ядер.

В свою очередь Ди Берардино и Хофнер (1983) использовали для трансплантации ядра неделящихся и полностью дифференцированных клеток крови – эритроцитов лягушки *Rana pipiens*.

В 1985 г. была описана технология клонирования костных рыб, разработанная советскими учеными Л. А. Слепцовой, Н. В. Дабагян и К. Г. Газарян. Зародыши на стадии бластулы отделяли от желтка. Ядра клеток зародышей вирыскивали в цитоплазму неоплодотворенных икринок, которые начинали дробиться и развивались в личинки.

В 1998 году исследователи Гавайского университета клонировали три поколения мышей из ядра взрослой клетки яичника, созданы линии эмбриональных стволовых клеток человека, ученым японского университета Кинки удалось клонировать восемь идентичных телят из клеток одной взрослой коровы.

В 2002 году достигнут большой прогресс в определении факторов, контролирующих дифференцировку стволовых клеток, идентифицировано более 200 генов, участвующих в этом процессе.

В 2004 году Корейские ученые создают первую линию человеческих эмбриональных стволовых клеток, полученную с помощью переноса ядра соматической клетки (терапевтическое клонирование).

### Типы культур животных клеток

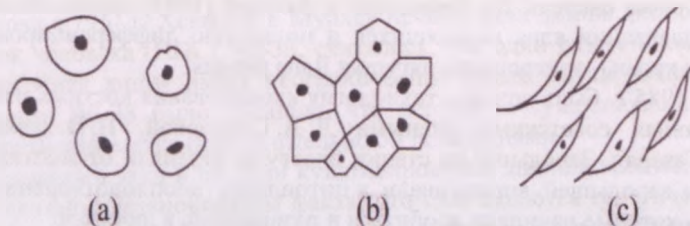
Культура клеток – это выращенные *in vitro* на специальных средах клетки различных тканей животных и человека, в том числе лейкоциты, сохраняющие присущие им обмен и восприимчивость к определенным вирусам.

Типы животных клеток, которые введены в культуру *in vitro* (рис. 86):

- элементы соединительной ткани (фибробласты, лимфоциты, моноциты, макрофаги);
- скелетные, мышечные (сердечные и гладкие мышцы);
- эпителиальные ткани (печень, легкие, почки, кожа, мочевого пузыря, почки, молочная железа и др.);
- клетки нервной системы;
- эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз, клетки островков Лангерганса);
- различные опухолевые клетки.

В настоящее время практически любые клетки человека и животных могут быть введены в культуру и тем самым служить средством и объектом во многих медико-биологических исследованиях.

В зависимости от методики первичной эксплантации ткани и техники ее культивирования различают несколько видов переживающих и растущих культур тканей и клеток.

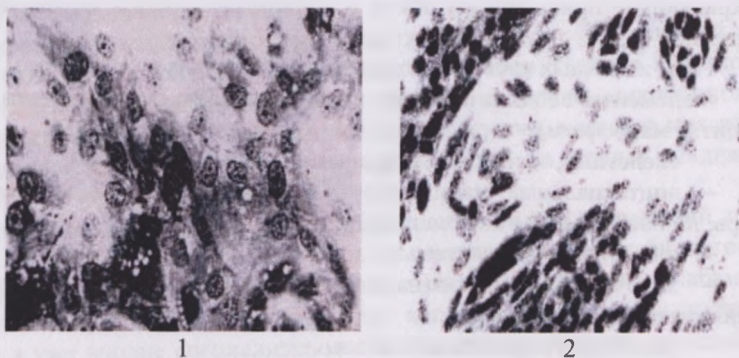


**Рисунок 86** – Типы животных клеток в культуре *in vitro*:  
 а) лимфоциты; б) эпителиальные клетки; в) фибробласты

Наибольшее распространение имеют однослойные, а также суспензионные культуры растущих клеток.

Различают два основных вида однослойных клеточных культур: первичные и перевиваемые.

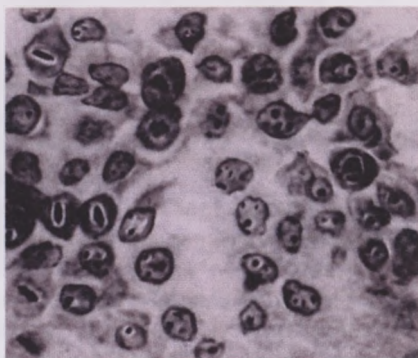
Термином «первичная» обозначают клеточную культуру, полученную непосредственно из тканей человека или животных в эмбриональном или постнатальном периоде (рис. 87). Срок жизни таких культур ограничен (20–30 суток). Периодическая смена среды, изменение ее состава и другие процедуры могут лишь несколько увеличить сроки жизни первичной клеточной культуры, но не могут предотвратить ее конечной деструкции и гибели.



**Рисунок 87** – Первичная культура клеток:  
 1 – клетки эпителио- и фибробластного типа (6 дней культивирования); 2 – почки эмбриона свиньи (преобладание эпителиоподобных клеток (6 дней культивирования))

Лишь отдельные клетки или группы клеток на фоне дегенерации большей части популяции могут сохранить способность к росту и размножению. Эти клетки при многократных перевивках дают начало перевиваемым культурам клеток.

Культура, обладающая способностью к неограниченному размножению (субкультивированию) *in vitro*, называется постоянной перевиваемой или стабильной клеточной линией (рис. 88).



**Рисунок 88** – Культура перевиваемой клеточной линии

Способность перевиваемых клеток к бесконечному размножению *in vitro* знаменует собой качественный скачок, в результате которого клетки приобретают способность к автономному существованию, подобно микроорганизмам, выращиваемым на искусственных питательных средах. Совокупность изменений, приводящих к появлению у клеток таких особенностей, называют трансформацией, а клетки перевиваемых тканевых культур – *трансформированными*.

Другим источником постоянных клеточных линий являются злокачественные новообразования, клетки которых уже трансформированы *in vivo* при развитии патологического процесса.

Различают линии и штаммы перевиваемых клеток:

- *линия клеток* – первичная культура со времени получения субкультуры (пересева);
- *стабильная линия клеток* – клетки, способные размножаться (пересеваться) *in vitro* до бесконечности;
- *линия диплоидных клеток* – линия клеток, в которой не менее 75% клеток сохранили нормальный исходный кариотип;

— *штамм клеток* — популяция однородных по одному или нескольким признакам диплоидных клеток, сохраняющая специфич. свойства в течение определенного периода (до 50 пассажей).

Таким образом, различают 3 основных типа культур животных клеток: **первичные культуры**, получаемые практически из любого органа и существующие лишь до первого пересева; диплоидные культуры, чаще получаемые из эмбриональных тканей и сохраняющие диплоидный набор хромосом до 50 пересевов, которые затем трансформируются в постоянные (перевиваемые) гетероплоидные культуры, существующие вне организма десятки лет.

Культуры клеток могут подразделяться *по виду животного*, от которого они происходят; по типу ткани-источника; по состоянию ткани на момент извлечения (нормальные, опухолевые), по способу выращивания (монослойные, суспензионные, на микроносителях и т. п.).

*По способу получения*: органые культуры; первичные культуры клеток; диплоидные культуры клеток; перевиваемые культуры клеток.

*По способу культивирования*: монослойные культуры клеток; суспензионные культуры клеток; смешанные культуры клеток.

В настоящее время практически любые клетки человека и животных могут быть введены в культуру и тем самым служить средством и объектом во многих медико-биологических исследованиях.

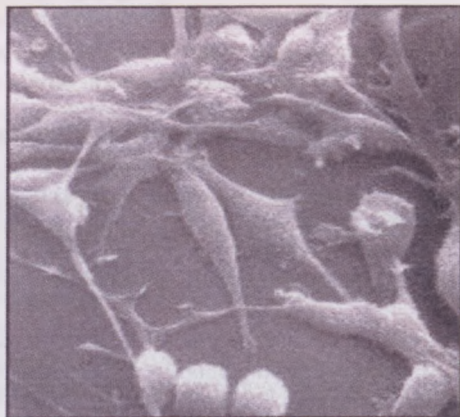
Наибольшее распространение получили культуры фибробластов (рис. 89). Широкое использование фибробластов обусловлено не только легкостью их культивирования, но и тем, что соединительная ткань, главным клеточным элементом которой они являются, составляет значительную часть массы тела. Фибробласты *in vitro* сохраняют важнейшие черты, свойственные клеткам в организме, а также онтогенетические и индивидуально-генотипические свойства организма-донора. Не существует другого такого типа клеток, который в полной мере мог бы представлять свойства клеток организма. Изменения, которые возникают при введении фибробластов в культуру, можно легко контролировать и свести к минимуму при создании соответствующих условий.

Гринбергом в 1978 г. была доказана возможность экстраполяции данных, полученных на культивируемых фибробластах, на условия *in vivo*.

Главным фактором при выборе ткани или линии клеток для дальнейшего исследования является природа процесса, который будет изучаться на этих клетках.

Как правило, культуры, полученные из эмбриональных тканей, характеризуются лучшей выживаемостью и более активным ростом по сравнению с культурами из соответствующих взрослых тканей, но не-

смотря на ряд практических преимуществ, необходимо помнить, что эти клетки по некоторым параметрам отличаются от взрослых клеток.



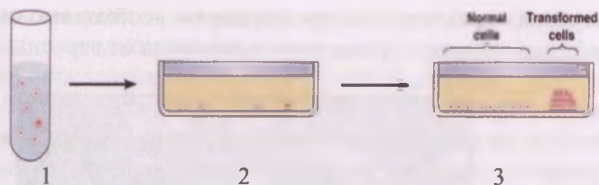
**Рисунок 89** – Фибробласты крысы

Нормальные ткани, как правило, дают начало культурам с ограниченным временем жизни, тогда как культуры клеток, полученные из опухолей, способны пролиферировать неограниченно долгое время.

### **Методы культивирования животных клеток и тканей**

Методов культивирования клеток вне организма много: можно культивировать кусочки органов, целые эмбрионы, нарезанные ткани, измельченные ткани, а также клетки, полученные при дезагрегации свежих тканей путем энзиматического переваривания. Именно последний метод нашел наиболее широкое применение, так как позволяет получать длительно поддерживаемые *in vitro*, хорошо пролиферирующие культуры клеток.

На первом этапе получения первичной культуры проводят стерильное удаление фрагмента ткани, органа животного и его механическую или ферментативную дезагрегацию. Ткань измельчается до кусочков объемом до 1–3 мм, кусочки ткани отмываются от эритроцитов раствором Хенкса с антибиотиками. Для дезагрегации ткани используют трипсин (0,25 % неочищенный или 0,01–0,05 % очищенный) или коллагеназу (200–2000 ед/мл, неочищенная) и другие протеолитические ферменты. Такой способ получения культуры обеспечивает высокий выход клеток (рис. 90).

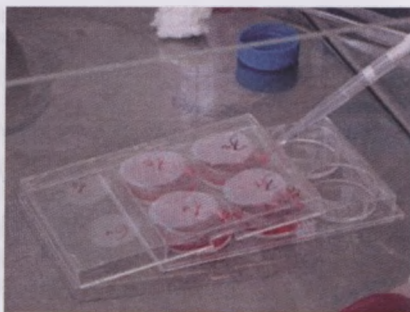


**Рисунок 90** – Технология получения и культивирования клеток животных:

1 – изолированные клетки получают, подвергая образцы тканей ферментативному диспергированию (трипсин); 2 – клетки ресуспенсируют в питательной среде; 3 – нормальные клетки растут в виде монослоя на поверхности культурального сосуда, трансформированные клетки не образуют монослой

Первичные культуры могут быть также получены от кусочков ткани, объемом 1 мм, которые прикрепляются к поверхности субстрата благодаря собственной адгезивности или наличию насечек на чашке, или с помощью сгустка плазмы.

В этих случаях будет происходить рост клеток из фрагментов. Клетки, мигрирующие из эксплантатов могут использоваться для пассивирования (рис. 91). Фрагменты ткани (эксплантаты) переносятся на новые чашки, мигрирующие клетки могут удаляться пересевом, смесью версена и трипсина, а остающиеся эксплантаты будут образовывать новые выросты.



**Рисунок 91** – Работа с культурой клеток: пассивирование клеток на новые культуральные матрасы

Известны такие первичные культуры, как культура фибробластов куриного эмбриона, культура клеток почки телянка, лейкоциты.

## Питательные среды для культивирования клеток животных

Питательная среда представляет собой раствор определенного состава, к которому добавляются компоненты невыясненного биологического происхождения (добавки плазмы, сыворотки крови, тканевые экстракты и т. д.). Основу питательных сред составляют солевые растворы. Минеральные компоненты в этих растворах подобраны так, что раствор выполняет буферные функции, поддерживая постоянный кислотно-щелочной баланс среды в процессе культивирования. Постоянство pH среды является одним из главных требований условий культивирования. Эти требования к питательным средам обеспечивают выживание клеток, их пролиферацию и дифференцировку.

Для приготовления питательных сред обычно используются солевые растворы Эрла и Хенкса. Эти растворы, используются также для орошения и промывки клеток при пассировании культур, выделении клеточных линий и других манипуляциях с культурами клеток.

Стандартные среды для ведения культур животных клеток – Игла MEM (minimal essential medium) и ВМЕ (basal medium, Eagle) (рис. 92). Чаще используется MEM. Она содержит минеральные вещества, аминокислоты (13 незаменимых), 6 водорастворимых витаминов, холин и инозит, выполняющие роль углеводородного субстрата. MEM используется только с сывороткой, так как в ней отсутствуют биотин, витамин В<sub>12</sub>, ионы железа и микроэлементы. Основа раствор Эрла.



Рисунок 92 – Питательные среды

Среда Дульбекко DME или DMEM (двойная модификация среды Игла). Используется при культивировании клеток различных типов, в том числе нетрансформированных клеток и гибридом. Является основой для бессывороточных сред. Содержит двойную концентрацию аминокислот, глицин, серин, пируват, железо. При использовании этой среды необходим инкубатор с 10% концентрацией CO<sub>2</sub>.

Среда Искова IMDM – модификация среда Дульбекко. Добавлены незаменимые аминокислоты, биотин, витамин B<sub>12</sub>, селенит натрия. В среду введен HEPES и уменьшены концентрации NaCl и NaHCO<sub>3</sub>. Среда бессывороточная, обычно используется для культивирования лимфоцитов и кроветворных клеток.

Среда МакКоя 5A и серия сред RPMI. Среда МакКоя 5A разработана в 1958 году для поддержания клонального роста клеток карциносаркомы Уолкера 256 в присутствии сыворотки, а затем уже других первичных культур и различных клеточных линий. Обычно производится в модификации Ивката и Грейса (RPMI) и предназначена для культивирования лейкоцитов в присутствии сыворотки, часто применяется и для культивирования гибридом. Концентрация CO<sub>2</sub> в атмосфере при культивировании 5 %.

Среда 199 разработана в 1950 году для культивирования фрагментов сердца из эмбриона цыпленка. Для среды характерны широкий спектр питательных веществ и невысокая их концентрация. Используется без добавок, как поддерживающая для первичных клеток, а с сывороткой как ростовая среда для быстро размножающихся клеток.

Сыворотка представляет собой чрезвычайно сложную смесь мелких и крупных молекул, способных как вызывать, так и тормозить рост клеток. Белки сыворотки, прямо и специфически участвующие в стимуляции клеточного деления, называются факторы роста. Большинство ростовых факторов присутствуют в сыворотке в концентрации нескольких нанограммов на миллилитр и ниже. Некоторые из этих факторов специфичны для клеток на определенной стадии дифференцировки, действие других не ограничено каким-либо одним типом клеток.

В последние годы разработаны бессывороточные среды для размножения клеток. Чаще всего эти среды узко специализированы, т.е. предназначены для определенного типа клеток. К базовой среде добавляется инсулин, трансферрин, гидрокортизон или его аналог дексаметазон и т. д.

Бессывороточные среды имеют определенные преимущества: улучшение воспроизводимости результатов опыта вследствие большей стабильности состава среды; снижение риска заражения культуры вирусами, грибами, микоплазмой; облегчение очистки продуктов клеточного

метаболизма; снижение влияния дополнительных белков на результаты биологических исследований; отсутствие цитотоксичности сыворотки. Культивирование клеток в присутствии сыворотки обнаруживает и ряд недостатков: для большинства тканей сыворотка не является физиологической жидкостью, с которой они контактировали в исходной ткани, поэтому, например, сыворотка вызывает рост фибробластов, но тормозит рост эпидермальных кератиноцитов; сыворотка может быть цитотоксичной, так как содержит полиаминоксидазу, действующую на полиамины (спермин, спермидин), являющиеся продуктами секреции быстро пролиферирующих клеток (эмбриональная сыворотка содержит относительно много такого фермента); значительная вариабельность состава сывороток разных партий; сыворотки могут содержать недостаточное количество специфических ростовых факторов, что вызывает необходимость добавления их к культурам клеток.

### **Системы культивирования клеток животных**

Клетки животных способны расти прикрепленными к твердой поверхности в виде монослоя (монослойное культивирование), либо в виде суспензий.

### **Монослойные культуры**

#### *Преимущества использования монослойных культур:*

1. Монослойные культуры могут быть применены к любому типу клеток, что обеспечивает наибольшую гибкость использования;

2. Легко провести полную замену среды и промыть клетки перед добавлением свежей питательной среды. Это важно в тех случаях, когда рост клеток идет в одних условиях, а наработка продукта в других условиях, например при переносе клеток из среды с сывороткой в бессывороточную среду. Можно также полностью удалять нежелательные компоненты;

3. Позволяют обеспечить высокую плотность клеток;

4. У многих клеток экспрессия требуемого продукта идет эффективнее, если клетки прикреплены к субстрату;

5. В некоторых случаях, например для пассирования вирусов, требуются тесные межклеточные контакты.

Однако при использовании монослойных культур выявляются и недостатки:

1) сложность масштабирования;

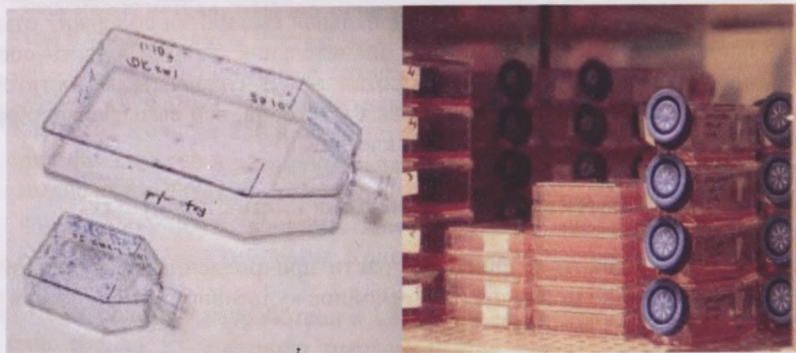
2) отсутствие информативности визуального анализа;

3) трудности с определением и поддержанием таких параметров, как кислотность и содержание  $O_2$ , и обеспечением гомогенности культуры клеток;

4) необходимость значительных пространств.

*Разновидности монослойного способа культивирования:*

1. Культивирование в плоских флаконах (матражах). Это так называемые стационарные культуры – культуры, растущие в неподвижных культуральных сосудах (рис. 93).



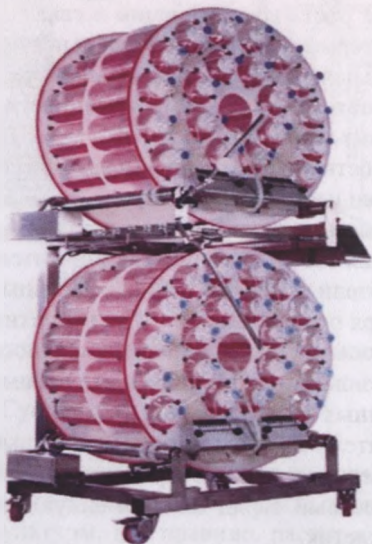
**Рисунок 93** – Пластиковые культуральные сосуды с площадью дна 25  $см^2$  (нижний флакон) и 150  $см^2$  (верхний флакон). На дне флаконов – колонии из МСК (мезенхимальные (стромальные) стволовые клетки)

2. Культивирование во вращающихся бутылках (роллерных аппаратах), когда в каждый момент времени 15–20 % поверхности бутылки покрыто питательной средой, а клетки находятся попеременно то в среде, то в воздухе.

Для роллерного культивирования используются специальные стеллажно-ярусные аппараты для вращения бутылей или барабаны. Большое значение имеет скорость вращения бутылей. Она не должна быть слишком большой, чтобы не препятствовать прикреплению клеток, но и не слишком низкой, так как длительное нахождение клеток в газовой фазе ухудшает условия их питания. В течение первых 30 мин после засева клеток обеспечивают высокую скорость вращения флаконов (1,0 об/мин) для равномерного распределения клеток, а затем переводят их на более низкую скорость вращения (20 об/час). Перемешивание осуществляют лопастными магнитными мешалками (100–200 об/мин) и круговыми качалками (15–40 об/мин). Для предотвращения оседания клеток на стенки сосудов производят их

силиконирование, поскольку силиконовое покрытие в силу своей гидрофобности препятствует прикреплению клеток.

Данный метод используют для получения вакцин (до 700 бутылок в каждой установке, сотни литров), рис. 94.



**Рисунок 94** – Роллерный аппарат

3. Культивирование в колонках на микроносителях. Метод «микроносителей» был предложен в 1967 г. Ван Верелем.

Суть его заключается в том, что клетки прикрепляются и размножаются на поверхности полимерных шариков-частиц «микроносителей» (МН), которые содержатся в суспензии с помощью перемешивающего устройства, например мешалки. На одной частице МН диаметром 160–230 мкм может поместиться 350–630 (или в среднем 460) клеток. В одном мл среды можно суспензировать несколько тысяч частиц микроносителя, при этом общая площадь их составит от нескольких до 50 см<sup>2</sup>/мл. Инокулированные в культиватор клетки прикрепляются к поверхности частиц МН и размножаясь, образуют сплошной монослой на каждой отдельной частице.

Основными преимуществами этого метода являются:

1) создание равномерных условий по всему объему сосуда, что делает возможным эффективно контролировать необходимые параметры (рН, рО<sub>2</sub> и др.);

- 2) получение высокой плотности клеточной популяции до 5–6 млн клеток в 1 мл;
- 3) культивирование одновременно несколько сот миллионов клеток;
- 4) введение постоянного контроля за динамикой роста клеток;
- 5) снижение роста контаминации в связи с сокращением операций, связанных с разгерметизацией культурального сосуда;
- 6) значительная экономия питательных сред;
- 7) возможность сохранять выросшие клетки непосредственно на чашках при низких температурах;
- 8) возможность искусственно создавать различные концентрации МН с выросшими на них клетками;
- 9) возможность пассирования культуры без применения трипсина путем добавления свежих порций микроносителя.

Микроносители – мелкие твердые частицы (поддерживаемые в суспензии благодаря перемешиванию), на поверхности которых клетки растут в виде монослоя. Использование микроносителей дает клеткам, обладающим адгезивными свойствами, все преимущества крупномасштабных суспензионных культур.

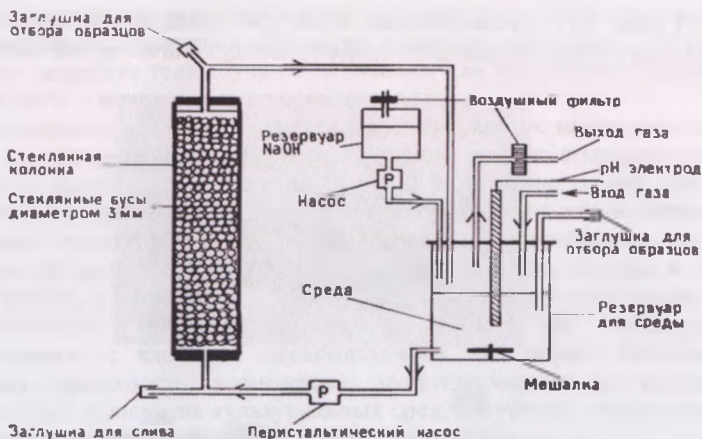
Микроносители должны быть нетоксичными, не сорбировать компоненты питательных сред и продукты метаболизма клеток, а также иметь поверхностный заряд или обменную емкость, достаточную для прикрепления клеток.

Коммерческие микроносители имеют диаметр 100–200 мкм и подразделяются на 6 основных групп:

- 1) декстрановые микроносители, поперечно сшитые, типа Cytodex 1;
- 2) декстрановые микроносители типа Cytodex 2;
- 3) микроносители, покрытые коллагеном или желатином, типа Cytodex 3;
- 4) полистиреновые микроносители типа Biosilon, Cytospheres;
- 5) стеклянные микроносители типа Bioglass;
- 6) целлюлозные микроносители типа ДЕ-53.

Используемые в настоящее время микроносители на основе микропористого желатина или пористого боросиликатного стекла имеют емкость около 3000 клеток/микроноситель.

Культивирование клеток на микроносителях проводят в обычных ферментерах для суспензионного культивирования (рис. 95).



**Рисунок 95** – Система культивирования на стеклянных бусах

### Суспензионные культуры

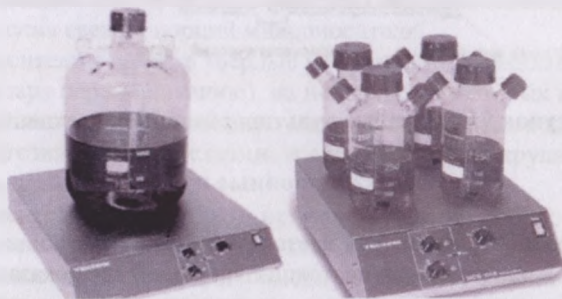
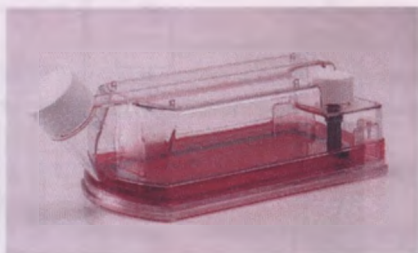
Способность животных клеток размножаться в жидкой среде в свободно суспендированном состоянии впервые была показана в 1953 г.

Суспензионные культуры, как правило, растут в питательной среде, дефицитной по ионам  $Ca^{2+}$ . Для предотвращения оседания клеток на внутренней поверхности сосуда производят силиконирование. Силиконовое покрытие в силу своей гидрофобности препятствует прикреплению клеток к стенке сосуда. Рекомендуется добавление метилцеллюлозы в концентрации 0,1–0,2%, молекулы которой образуют защитный слой клеток, предотвращающий их повреждение при перемешивании среды.

Суспензионное культивирование клеток также можно проводить в ферментерах, предназначенных для суспензионного культивирования микроорганизмов, в которых постоянное перемешивание клеток в среде осуществляется магнитными или механическими мешалками в колбах с высокой скоростью вращения, препятствующей прикреплению клеток к стенкам сосудов (рис. 96).

Суспензионное культивирование дает, по меньшей мере, 2–3-кратную экономию питательных сред, по сравнению с общепринятым стационарным монослойным культивированием при полном исключении дорогостоящих протеолитических ферментов и буферных раство-

ров. Кроме того, суспензионные культуры представляются предпочтительными с точки зрения получения больших количеств биомассы.



**Рисунок 96** – Выращивание суспензионных культур: флаконы для выращивания суспензионной клеточной культуры

### **Культивирование клеток и тканей беспозвоночных**

Первые попытки культивирования клеток насекомых были приняты в начале XX века. Однако среди ученых длительное время было распространено мнение, что выращивание клеток беспозвоночных в культуре не имеет практического значения. По этой причине исследования в области культуры клеток насекомых велись недостаточно активно.

Прогресс в получении клеточных линий насекомых был последовательно обеспечен трудами В. Трагера в конце 30-х годов XX столетия, С. Вьятта (1956), Т. Грейса (1962).

Интенсивные исследования проблемы начались именно в 60-х гг., когда Грейс, модифицировав среду Вьятта, получил первые четыре стабильные перевиваемые линии из тканей яичников эвкалиптового шелкопряда. В 1976 г. уже насчитывалось более 120 перевиваемых линий клеток насекомых, а к 1985 г. их количество превысило 200.

Для получения культуры клеток и тканей беспозвоночных используют эмбрионы, имагинальные диски и органы насекомых, гомоциты, яичники, жировые тела. Лучшие источники для получения культивируемых клеток – личинки и куколки насекомых.

Методика получения первичных культур клеток насекомых достаточно отработана. Она включает следующие этапы: стерилизация поверхности насекомых и подлежащих культивированию тканей; диссоциация клеток; пересадка их на питательную среду. Срок жизни первичных клеточных культур ограничен. Через определенное время культура стареет, что проявляется в грануляции цитоплазмы, сморщивании и округлении клеток, потери связей между клетками и твердым субстратом.

Клеточные культуры насекомых имеют ряд преимуществ по сравнению с клетками млекопитающих как объект биотехнологических производств: возможность культивирования при комнатной температуре, дешевизна культуральных сред, отсутствие необходимости в  $\text{CO}_2$  инкубаторах, высокая плотность в культуре и др.

Среды для культивирования клеток и тканей насекомых сильно варьируют по составу. При составлении питательных сред часто руководствуются данными по составу гемолимфы, различающейся у разных видов насекомых. В настоящее время предложено более 50 вариантов питательных сред для культивирования клеток беспозвоночных. Все эти среды отличаются от сред для клеток млекопитающих наличием органических кислот, повышенным содержанием аминокислот и более высоким осмотическим давлением. Ни одна из этих сред ни пригодна для поддержания культур клеток всех видов беспозвоночных, т. е. не является универсальной.

Наиболее часто используют среды Митсухаси и Марамороша (среда ММ), Шилда и Санга (среда МЗ), Шнейдера; Эхальера и Оганесяна (среда D-22), IPL-41 и другие. Фирма Sigma (США) выпускает указанные среды в сухом виде.

Культуры клеток беспозвоночных животных представляют огромный интерес для изучения молекулярных механизмов взаимодействия хозяин – паразит, роли мобильных генетических элементов в адаптации беспозвоночных к стрессовым ситуациям окружающей среды, регуляции действия генов в клетках высших организмов и клеточных механизмов дифференцировки и т. д.

### **Области применения культур клеток животных в биотехнологии**

Первой областью, где культуры клеток животных нашли широкое применение, является вирусология. Применение клеточных технологий в вирусологии основывается на том, что вирусы являются внутриклеточными паразитами, и не могут развиваться вне клеток. Кроме научно-

исследовательских работ по изучению биологии вирусов культуру клеток в вирусологии применяют для крупномасштабного получения вирусных вакцин (рис. 97).



**Рисунок 97** – Типичный биотехнологический процесс изготовления инактивированных вакцин против вирусных инфекций

Переход на культуру клеток (взамен использования куриных эмбрионов) исключает возможность аллергических реакций на белки куриных эмбрионов, а также заражения ретровирусами кур. Ученые ГНЦ ВБ «Вектор» отмечают, что производство вакцины на основе культуры клеток является также более выгодным в экономическом плане: с одного 50-литрового биореактора можно получить до 100 тыс. доз вакцины (для производства такого количества эмбриональной вакцины требуется 10 тыс. куриных эмбрионов).

Сейчас методами клеточных культур производятся вакцины против многих вирусных заболеваний человека (корь, краснуха, свинка, полиомиелит) и животных (бешенства, болезни Марека, болезни Ньюкасла, чумы крупного рогатого скота и т.д.), табл. 8.

Разработки в области генетической инженерии клеток животных, позволили осуществить производство биоматериалов из клеток животных, обработанных методами генетической инженерии.

Активно проводятся исследования по разработке противораковых вакцин. Идея создания противораковых вакцин основывается на факте, что существует много общих генов, которые могут присутствовать как в канцерогенных вирусах, так и в нативных клетках млекопитающих, и что эти гены будут индуцируют белки на поверхности раковых клеток. Следовательно экспрессия канцерогенных вирусов в клетках животных будет индуцировать образование опухолевых белков, которые могут использоваться в качестве вакцин против опухолей. Такие вакцины генерируют выработку специфических антител способных выявлять и уничтожать опухолевые клетки.

**Таблица 8 – Клеточные культуры, применяемые для производства противовирусных вакцин**

Культуры клеток	Вакцины	
	Живые	Инактивированные
Фибропласты куриных эмбрионов	Бешенство, болезнь Ауески, болезнь Ньюкасла, болезнь Марека, энцефалит лошадей, чума плотоядных, оспа птиц	Болезнь Ауески, энцефалит лошадей
Почки свиньи	Классическая чума свиней, парвовирусная инфекция свиней	
Почки овцы	Катаральная лихорадка овец	Ящур
Почки крупного рогатого скота	Чума, ринотрахеит и диарея крупного рогатого скота	Ящур
Почки собаки	Гепатит собак, чума плотоядных	
Почки кролика	Миксоматоз кроликов	Болезнь Ауески
Почки морской свинки	Классическая чума свиней	
Почки хомяка	Бешенство	
Почки эмбриона овцы	Контагиозная пустулезная эктима, дерматит овец (КПД)	
Тестикулы ягнят	Классическая чума свиней	
Постоянные (перевиваемые) линии клеток	Чума плотоядных, бешенство, трансмиссивный гастроэнтерит свиней, ротавирусная болезнь свиней	Ящур, бешенство, болезнь Ауески, болезнь Тешена, парвовирусная болезнь свиней

Отдельным направлением является использование культур клеток для получения биологически активных веществ. Способность дифференцированных клеток, специализировавшиеся в процессе развития на выполнении определенных функций синтезировать биологически активные вещества обладают легли в основу применения клеточных технологий в крупномасштабном производстве ферментов, гормонов и т. д.

Не возможно переоценить значение метода культур клеток для развития иммунологии. Успехи культивирования иммунокомпетентных клеток развили целый ряд самостоятельных научных направлений. Известно, что иммунокомпетентные клетки обладают высокой секреторной активностью. Клетки иммунной системы продуцируют ряд лимфокинов, около 60 монокинов. Особую важность имеет тот факт, что начато массовое применение интерферонотерапии, и культура клеток является основным источником продукции препарата.

Культуры животных клеток являются важными продуцентами многих клеточных продуктов, например, противовирусного агента интерферона.

Из иммунокомпетентных клеток можно выделить и другие иммуномодуляторы и иммуномедиаторы, а также ряд не специфических биологически активных веществ как лизоцим, комплемент, простагландины и т.д.

Клеточные культуры часто применяют при тестировании и изучении механизма действия лекарственных и косметических средств, пестицидов, консервантов и т. п. Методы культуры клеток нашли широкое применение для реконструкции различных тканей и органов. Так, культура клеток кожи используется для заместительной терапии при ожогах, культура клеток эндотелия для реконструкции стенок сосудов. Способность клеток к росту в культуре привела к развитию методов клонирования, хранения и слияния клеток, что, в свою очередь, вызвало становление новой области науки генетики соматических клеток. Органные культуры используются при изучении закономерностей развития органов, для изучения способов сохранения жизнеспособности изолированных органов, предназначенных для трансплантации.

Развитие клеточных технологий позволило получать некоторые виды гормонов, инсектицидов (это вирусы против насекомых) и ферментов из клеток различных дифференцированных органов.

Еще одним практическим использованием клеточных технологий заключается в помещении клеток различных органов в специально сконструированные камеры, которые имплантируются в живой организм и экспрессируются в этой форме как искусственные органы или железы.

В заключении культуру животных тканей применяют для изучения механизмов роста и дифференцировки клеток, гистогенеза, межклеточных и межклеточных взаимодействий, обмена веществ и т. п.

### Контрольные вопросы:

- 1 Перечислите типы культивируемых клеток животных.
- 2 Какие питательные среды и субстраты используют для культивирования животных клеток.
- 3 В чём заключаются преимущества и недостатки монослойных клеточных культур?
- 4 Культивирование суспензионных клеточных культур животных клеток на микроносителях.
- 5 Применение культуры животных клеток в биотехнологии и фармакологии.

## ТЕМА 12. ТИПОВАЯ СХЕМА И ОСНОВНЫЕ СТАДИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

### – Основные стадии биотехнологического производства

Типовая схема биотехнологических производств – это последовательность стадий производства в каждой из которых сырье претерпевает определенные технологические воздействия и последовательно превращается во все более сложные полупродукты и, наконец, в конечный биотехнологический продукт.

Стадии биотехнологического процесса включают:

- 1) подготовку сырья (питательной среды) субстрата с заданными свойствами для культивирования промышленного микроорганизма;
- 2) подготовку биообъекта – посевной культуры (чистой культуры) или фермента, в том числе и иммобилизованного для внесения в основной аппарат – ферментер;
- 3) основную ферментацию (биосинтез, биотрансформация (ферментация) – образование целевого продукта за счет превращения компонентов питательной среды в биомассу, затем, если это необходимо, в целевой метаболит.
- 4) выделение и очистка целевого продукта.
- 5) получение товарных форм продукта.

Продукты биотехнологии получают по индивидуальным технологиям со своими биологическими агентами, сырьем, числом стадий производства и их технологическими режимами. Тем не менее, можно представить себе обобщенную типовую схему биотехнологических производств. Схема состоит из стадий, в каждой из которых сырье претерпевает определенные технологические воздействия и последовательно превращается во все более сложные полупродукты и, наконец, в конечный продукт. Общий вид такой типовой схемы представлен на рисунке 98.

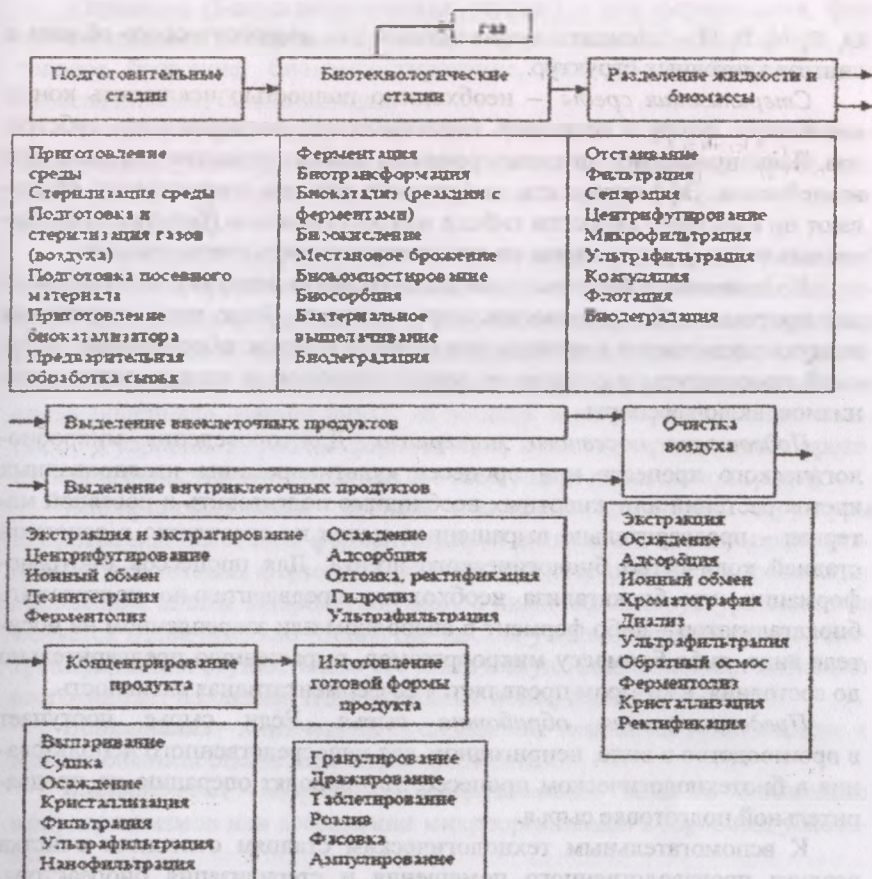


Рисунок 98 – Типовая схема, основные стадии и технологические процессы в биотехнологических производствах

### Подготовительные стадии

Подготовительные стадии служат для приготовления и подготовки необходимых видов сырья биотехнологической стадии.

На стадии подготовки могут быть использованы следующие процессы: выбор рецептуры среды и ее приготовление, обычно жидкой, включающей необходимые компоненты питания для биотехнологической стадии. Особенностью биообъектов является потребность в многокомпонентных энергетических и пластических субстратах, содержащих

O, C, N, P, H – элементы необходимые для энергетического обмена и синтеза клеточных структур.

*Стерилизация среды* – необходимо полностью исключить контаминантную флору и сохранить биологическую полноценность субстратов. Чаще применяют автоклавирование, реже химические и физические воздействия. Эффективность выбранного режима стерилизации оценивают по константе скорости гибели микроорганизмов (берется из специальных таблиц) умноженная на продолжительность стерилизации.

*Подготовка и стерилизация газов* (обычно воздуха), необходимых для протекания биотехнологического процесса. Чаще всего подготовка воздуха заключается в очистке его от пыли и влаги, обеспечении требуемой температуры и очистке от присутствующих в воздухе микроорганизмов, включая споры.

*Подготовка посевного материала.* Для проведения микробиологического процесса или процесса культивирования изолированных клеток растений или животных необходимо подготовить и посевной материал – предварительно выращенное малое по сравнению с основной стадией количество биологического агента. Для процессов биотрансформации или биокатализа необходимо предварительно подготовить биокатализатор – либо фермент в свободном или закрепленном на носителе виде, либо биомассу микроорганизмов, выращенную предварительно до состояния, в котором проявляется ее ферментативная активность.

*Предварительная обработка сырья.* Если сырье поступает в производство в виде, непригодном для непосредственного использования в биотехнологическом процессе, то проводят операцию по предварительной подготовке сырья.

К вспомогательным технологическим стадиям относится очистка воздуха производственного помещения и стерилизация биореактора, подготовка посуды и оборудования, обеспечение асептических условий проведения процесса культивирования, установка системы контроля за ходом культивирования. Выбор ферментера осуществляется с учетом критериев дыхания биообъекта, теплообмена, транспорт и превращения субстрата в клетке, скорость роста единичной клетки, время ее размножения и т. п.

### **Основная стадия биотехнологического производства**

Основной стадией является собственно биотехнологическая стадия, на которой с использованием того или иного биологического агента (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов или клеточных органелл) происходит преобразование сырья в тот или иной целевой продукт.

Основные (Биотехнологические стадии) – это ферментация, биотрансформация, биокатализ (реакции с ферментами), биоокисление, метановое брожение, биокомпостирование, биосорбция, бактериальное выщелачивание, биодеградация.

*Стадия ферментации* является основной стадией в биотехнологическом процессе, так как в ходе ее происходит взаимодействие продуцента с субстратом и образование целевых продуктов (биомасс, эндо- и экзопродуктов).

Эта стадия осуществляется в биохимическом реакторе (ферментере) и может быть организована в зависимости от особенностей используемого продуцента и требований к типу и качеству конечного продукта различными способами. Ферментация может проходить в строго асептических условиях и без соблюдения правил стерильности (так называемая «незащищенная» ферментация); на жидких и на твердых средах; анаэробно и аэробно. Аэробная ферментация, в свою очередь, может протекать поверхностно или глубинно (во всей толще питательной среды).

*Биотрансформация* – процесс изменения химической структуры вещества под действием ферментативной активности клеток микроорганизмов или готовых ферментов. В этом процессе обычно не происходит накопления клеток микроорганизмов, а химическая структура вещества меняется незначительно. Вещество как бы уже в основном готово, биотрансформация осуществляет его химическую модификацию: добавляет или отнимает радикалы, гидроксильные ионы, дегидрирует и т. п.

*Биокатализ* – химические превращения вещества, протекающие с использованием биокатализаторов-ферментов.

*Биоокисление* – потребление загрязняющих веществ с помощью микроорганизмов или ассоциации микроорганизмов в аэробных условиях.

*Метановое брожение* – переработка органических отходов с помощью ассоциации метаногенных микроорганизмов в анаэробных условиях.

*Биокомпостирование* – снижение содержания вредных органических веществ ассоциацией микроорганизмов в твердых отходах, которым придана специальная взрыхленная структура для обеспечения доступа воздуха и равномерного увлажнения.

*Биосорбция* – сорбция вредных примесей из газов или жидкостей микроорганизмами, обычно закрепленными на специальных твердых носителях.

*Бактериальное выщелачивание* – процесс перевода нерастворимых в воде соединений металлов в растворенное состояние под действием специальных микроорганизмов.

**Биодеградация** – деструкция вредных соединений под воздействием микроорганизмов – биодеструкторов. Обычно биотехнологическая стадия имеет в качестве выходных потоков один жидкостной поток и один газовый, иногда только один – жидкостной. В случае если процесс протекает в твердой фазе (например, созревание сыра или биокомпостирование отходов) выходом является поток переработанного твердого продукта.

### **Выделение и очистка целевого продукта**

Стадия выделения целевого продукта из культуральной жидкости или из гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции.

**Осаждение** – физическое (нагревание, охлаждение, разбавление, концентрирование); химическое (с помощью неорганических и органических веществ – этанол, метанол, ацетон, изопропанол).

**Экстракция** – процесс избирательного извлечения одного или нескольких растворимых компонентов из твердых тел и растворов с помощью жидкого растворителя – экстрагента.

**Типы экстракции:** твердо-жидкостная (вещество из твердой фазы переходит в жидкую) – например, хлорофилл из спиртовой вытяжки переходит в бензин; жидко-жидкостная (вещество переходит из одной жидкости в другую (извлечение антибиотиков, витаминов, каротиноидов, липидов)).

Экстрагенты: фенол, бензиловый спирт, хлороформ, жидкий пропанол, бутан и др.

**Адсорбция** – частный случай экстракции, когда экстрагирующий агент является твердым телом – идет по ионообменному механизму.

В качестве адсорбентов используют иониты на основе целлюлозы: катионит-карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ); анионит – диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ), сефадексы на основе декстрана и т.д.

**Стадия очистки биотехнологического продукта включает этапы:**

- 1) сепарация – разрушение клеточных оболочек (дезинтеграция биомассы);
- 2) отделение клеточных стенок;
- 3) отделение и очистка продукта;
- 4) тонкая очистка и разделение препаратов.

*Сепарация* – отделение массы продуцента от жидкой фазы. Передварительно для повышения эффективности может проводиться: изменение pH, нагревание, добавление коагулянтов белков или флокулянтов.

Существуют следующие способы сепарации.

1. *Флотация* (буквально – плавание на поверхности воды) – разделение мелких частиц и выделение капель дисперсной фазы из эмульсий. Основана на различной смачиваемости частиц (капель) жидкостью (преимущественно водой) и на их избирательном прилипании к поверхности раздела, как правило, жидкость – газ (очень редко: твердые частицы – жидкость).

Основные виды флотации: пенная (культуральную жидкость с биомассой микроорганизмов непрерывно вспенивают воздухом, подаваемым снизу вверх под давлением, клетки и их агломераты «прилипают» к пузырькам тонкодиспергированного воздуха и всплывают вместе с ними, собираясь в специальном отстойнике); масляная, пленочная.

2. *Фильтрация* – используется принцип задержки биомассы на пористой фильтрующей перегородке. Используются фильтры: однократного и многократного использования; периодического и непрерывного действия (с автоматическим удалением слоя биомассы, забивающего поры); барабанные, дисковые, ленточные, тарелочные, карусельные вакуум-фильтры, фильтры-прессы различной конструкции, мембранные фильтры.

3. *Физическое осаждение*. Если биомасса содержит заметных количеств целевого продукта, она осаждается добавлением извести или других твердых компонентов, увлекающих клетки или мицелий на дно.

4. *Центрифугирование*. Осаждение взвешенных частиц происходит под действием центробежной силы с образованием двух фракций: биомассы (твердой) и культуральной жидкости. Центрифугирование и фильтрация могут проходить одновременно в фильтрационных центрифугах. Высокоскоростное центрифугирование разделяет клеточные компоненты по размеру: более крупные частицы при центрифугировании движутся быстрее.

**Стадия разрушения клеточных оболочек (дезинтеграция биомассы)** используется, если искомые продукты находятся внутри клеток продуцента. При этом применяют различные методы дезинтеграции: физические, химические, комбинированные.

*Физические методы* – обработка ультразвуком, вращение лопасти или вибратора, встряхивание со стеклянными бусами, продавливание через узкое отверстие под давлением, раздавливание замороженной клеточной массы, растирание в ступке, осмотический шок, замораживание-

оттаивание, декомпрессия (сжатие с последующим резким снижением давления).

*Химические и химико-ферментативные методы* – клетки могут быть разрушены толуолом или бутанолом, антибиотиками, ферментами. Примеры: клетки грамотрицательных бактерий обрабатывают лизоцимом в присутствии этилендиамина-те-рауксусной кислоты или других детергентов, клетки дрожжей – зимолизой улитки, ферментами грибов и т.д.

## Получение товарных форм продукта

Последней стадией технологического цикла в биотехнологическом производстве является получение *товарной формы продукта*.

Все товарные формы биотехнологического продукта с точки зрения технологии их получения можно разделить на три основные группы.

1. Биопрепараты, имеющие в товарном продукте в качестве основного компонента жизнеспособные микроорганизмы. К этой группе относятся средства защиты растений, бактериальные удобрения, закваски для силосования кормов, биодеграданты, другие активные средства биотрансформации.

2. Биопрепараты, в состав которых входит инактивированная биомасса клеток и продукты ее переработки. Это кормовые дрожжи, грибной мицелий и т.д.

3. Биопрепараты на основе очищенных продуктов метаболизма микроорганизмов. К ним относятся витамины, аминокислоты, ферменты, антибиотики, биолипиды, полисахариды, продукты комплексной переработки микробных масс и метаболитов.

В зависимости от принятых на предыдущей стадии решения товарные формы представляют собой либо сложную смесь, содержащую некоторое количество основного вещества, либо высокоочищенный препарат, отвечающий ряду специальных требований.

Продукт может выпускаться в жидком (например, жидкий концентрат лизина) или сухом виде (белково-витаминный концентрат, энтомопатогенные препараты, кормовой концентрат лизина). Стадия фасовки рассмотренных комплексных препаратов заключается в помещении их в тару (мешки, барабаны и т. п.), размеры и тип которой определяются потребностями заказчика и свойствами продукта (его слеживаемостью, гигроскопичностью, стойкостью к загниванию и т. д.). Другие требования предъявляются к медицинским препаратам и биохимическим реактивам.

## Классификация продуктов биотехнологических производств

Биотехнологическая система – это совокупность компонентов и условий биотехнологии.

Все биотехнологические производства по их направленности делятся на две группы.

Первая преследует цель получения максимально возможных количеств биомассы, это могут быть живые клетки (например, хлебопекарные дрожжи), биомасса нежизнеспособных клеток как источник кормового белка, витаминов, споры с токсинами (препараты для защиты растений от вредителей).

Вторая преследует цель максимального выхода продуктов жизнедеятельности клеток микроорганизмов, тканей и органов растений и животных (первичных метаболитов – аминокислоты, нуклеотиды, моносахариды, витамины, коферменты, органические кислоты; вторичных – алкалоиды, флавоноиды, антибиотики, пигменты, токсины и др.). При этом клетки продуцента являются отходом производства, требующим утилизации.

### Примеры биотехнологических производств Производство кормового лизина

Лизин образуют многие микроорганизмы: бактерии, актиномицеты, сине-зеленые водоросли, некоторые виды микроскопических грибов. В организме человека и животных лизин определяет биологическую ценность белка, способствует секреции пищеварительных ферментов и транспорту кальция в клетки, улучшает общий азотный баланс в организме. При добавлении лизина в рационы животных (0,1–0,4 %) значительно увеличивается коэффициент использования кормового белка, что приводит к снижению расхода кормов.

В качестве продуцентов лизина используют бактерии родов *Corinebacterium* (*C. glutamicum*), *Micrococcus*, *Brevibacterium*. Питательной средой является меласса или уксусная кислота.

Процесс получения лизина включает несколько подготовительных стадий: получение посевного материала, приготовление сложной многокомпонентной среды, ее стерилизация, компримирование и стерилизация воздуха. На стадии концентрирования образующуюся в процессе ферментации культуральную жидкость сначала выпаривают под вакуумом и затем сушат (рис. 99).

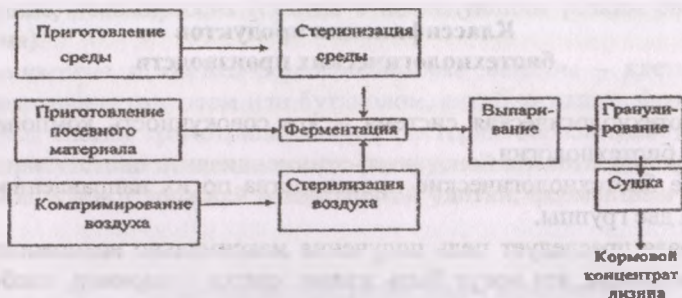


Рисунок 99 – Производство кормового лизина

### Производство биогаза

Общая схема производства биогаза довольно проста (рис. 100).

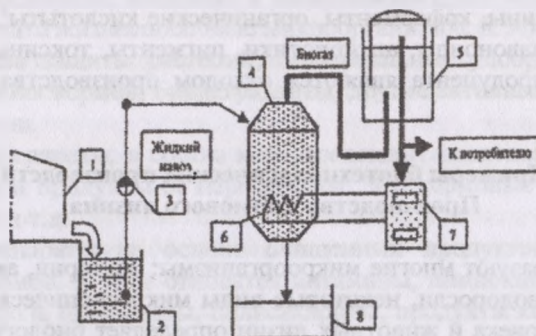


Рисунок 100 – Схема производства биогаза:

- 1 – ферма; 2 – навозоприемник; 3 – насос; 4 – метантанк; 5 – газгольдер;  
6 – теплообменник; 7 – котел; 8 – хранилище удобрения

Вначале сырье смешивается и измельчается до получения полужидкой гомогенной массы в приемном танке. Далее масса нагревается до 70°C не менее 1 часа с целью уничтожения бактерий. После охлаждения сырье перекачивается в автоклав (биореактор-метантанк, ферментатор), где оно подвергается анаэробному брожению при температуре 38 °С. Процесс получения биогаза длится обычно около 1 месяца.

Существуют 2 режима брожения: мезофильный – 25–38°C – оптимум 37°C (работают мезофильные бактерии) и термофильный – 45–60°C – оптимум 56°C (работают термофильные бактерии). Для интенсификации брожения добавляют катализаторы (глюкозу и целлюлозу). Ре-

комендуется перемешивание субстрата в ферментаторе с целью предупреждения образования в верхней части слоя всплывающего вещества и корки (это улучшает технологический процесс и соответственно снижает энергозатраты). Биогаз под собственным давлением (не более 0,5 атм.) через газовый штуцер и конденсатор (для удаления влаги) подается в газгольдер, откуда используется либо для сжигания в бытовых приборах, либо для производства электрической и тепловой энергии в когенерационной энергоустановке. Полностью автономный, энергонезависимый биореактор потребляет 10–25% вырабатываемого газа для своих нужд. Это требуется для осуществления термостатирования и перемешивания. Сброженная масса через штуцер удаления эвакуируется и накапливается в бункере-отстойнике. Твердый остаток является хорошим обеззараженным удобрением (обычно содержание азота – 3,5 кг/тонну, фосфора – 0,8 кг/тонну, калия – 1,4 кг/тонну). При оптимальном сбраживании остаток биоудобрения составляет 30% от массы исходного сырья, а остальные 70% органических веществ разлагаются. Теплотворная способность биогаза 22–24 тыс. кДж/м<sup>3</sup>, или 5500 ккал/м<sup>3</sup>. Один кубометр биогаза равен 0,6 м<sup>3</sup> природного газа, 0,7 л мазута, 0,4 л бензина, 3,5 кг дров.

Исходное сырье для получения биогаза имеет 3 главных источника:

- органические отходы животноводства и птицеводства;
- твердый остаток сточных вод на полях орошения;
- силос и биомасса сельскохозяйственных культур.

Биогаз можно получать на свалках, из сточных вод, кукурузного силоса, навозной жижи, зерновых и т. д. Большая часть его применяется для получения электроэнергии и обогрева и лишь незначительная часть используется в качестве транспортного горючего.

### Контрольные вопросы:

- 1 Назовите и охарактеризуйте стадии биотехнологического производства.
- 2 Перечислите методы культивирования микроорганизмов.
- 3 Назовите общую характеристику и типы периодического культивирования.
- 4 Охарактеризуйте непрерывное культивирование и его виды.
- 5 Какие операции осуществляют на стадии выделения и очистки целевого продукта?
- 6 Какие существуют формы товарных продуктов в биотехнологическом производстве?
- 7 Приведите примеры биотехнологических производств.

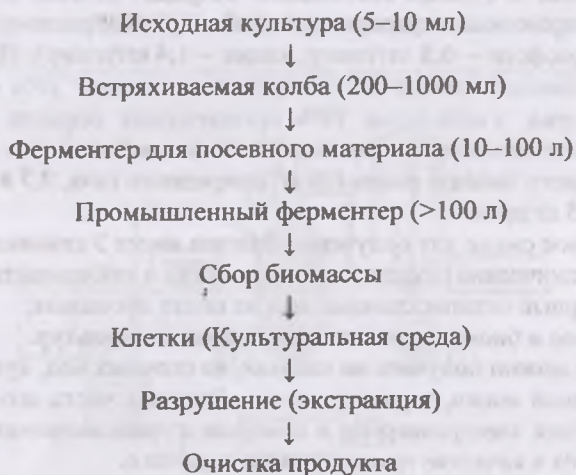
## ТЕМА 13. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

### Технология культивирования микроорганизмов

Культивирование – это создание искусственных условий для обеспечения процессов жизнедеятельности и размножения микроорганизмов.

Обобщенная схема промышленного выращивания микроорганизмов с целью получения конечных продуктов представлена на схеме:

#### Схема промышленного выращивания микроорганизмов



Обычно процедура начинается с приготовления и стерилизации культуральной среды и оборудования. Сначала выращивают исходную культуру (5–10 мл), затем инкубируют ее во встряхиваемой колбе (200–1000 мл), после чего переносят в ферментер для посевного материала (10–100 л) и, наконец, в промышленный ферментер (1000–1000000 л). По завершении ферментации клетки выделяют из культуральной среды центрифугированием или фильтрацией. Если продукт локализован внутри клеток, последние разрушают, удаляют клеточные осколки и выделяют продукт из осветленной среды. Секретируемый продукт выделяют непосредственно из среды.

## Методы ферментации

В том случае, когда культура растет на поверхности жидкой или плотной питательной среды, потребляя содержащиеся в ней субстраты и выделяя в эту среду продукты метаболизма, такой способ культивирования называют *поверхностным*.



При поверхностном культивировании клетки растут на поверхности твердой (плотной) среды, содержащей достаточное количество влаги и питательных веществ (чаще всего основу такой среды составляют пшеничные отруби).

При жидкофазном (глубинном) культивировании, микроорганизмы распределяются по всему объекту жидкой питательной среды, а кислород поступает к клеткам в результате интенсивной операции перемешивания.

Последний способ наиболее широко применяется в настоящее время в производстве большинства препаратов по следующим причинам.

1. Позволяет получить большое количество бактериальной массы за короткое время. Так, при культивировании микроорганизмов группы кишечной палочки в условиях состояния покоя количество микробов не превышает

1–2 млрд см<sup>3</sup>, а с применением принудительной аэрации урожайность, в зависимости от состава питательной среды, достигает 50–60 млрд см<sup>3</sup>. Это объясняется тем, что при аэрации практически отсутствует начальная стационарная фаза, и бактерии сразу начинают интенсивно размножаться, переходя в логарифмическую фазу.

2. Процесс легко управляем. При глубинном выращивании имеются существенные различия в степени потребления углеродных и азотистых веществ. Они интенсивно потребляются при аэрации культуральной

жидкости, поэтому, чтобы процесс роста и размножения не прекращался быстро, нужно в процессе культивирования дополнительно вводить углеродные и азотистые соединения, а при необходимости и другие стимуляторы роста микроорганизмов. Добавление питательных веществ, особенно углеводных (глюкоза) и биологических стимуляторов усиливает интенсивность размножения, что и приводит к увеличению концентрации микроорганизмов в момент съема их биомассы. Данный способ также позволяет легко корректировать рН среды в процессе культивирования, что очень важно для достижения максимальной интенсивности размножения.

3. Максимальная технологичность. Так, поверхностный метод менее технологичен и в промышленных условиях применяется в исключительных случаях, когда нельзя воспользоваться глубинным методом.

Технологический процесс глубинного выращивания микроорганизмов в биореакторах (ферментерах, рис. 101) так же, как и при использовании плотных питательных сред, складывается из следующих этапов:

1. Отбор штаммов микроорганизмов и работа с ними.
2. Приготовление посевной микробной культуры.
3. Приготовление и стерилизация питательных сред.
4. Подготовка биореактора к посеву.
5. Выращивание микроорганизмов в реакторе и контроль над процессом культивирования.

Кроме того, он включает ряд вспомогательных операций:

- стерилизацию оборудования и коммуникаций;
- приготовление и стерилизацию пеногасителей, растворов и др.

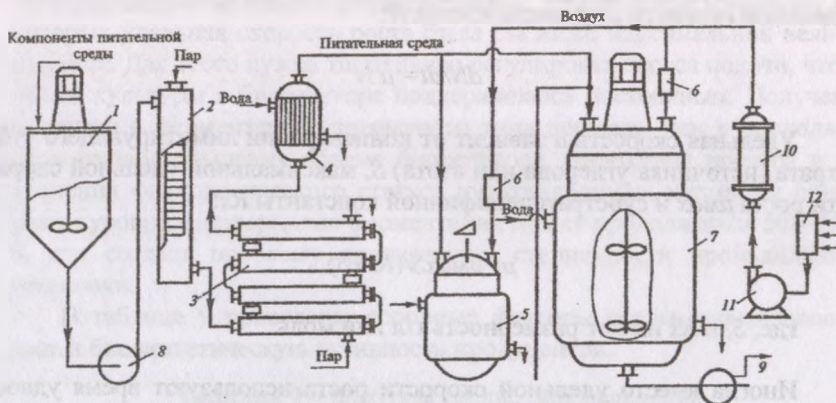
Остановимся на каждом из этапов культивирования. В промышленных условиях для этих целей применяют ферментеры из нержавеющей стали, снабженные приспособлениями для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха.

Сначала ферментер заполняют питательной средой, автоклавируют, а затем засевают чистой культурой, подаваемой из специального генератора. Для предотвращения контаминации (инфекции) в ферментере поддерживают повышенное давление наряду с оптимальными значениями рН, температуры, редокс-потенциала и другими условиями культивирования. В настоящее время наиболее прогрессивным признан проточный метод культивирования микроорганизмов, который обеспечивает непрерывную подачу в ферментер как питательной среды, так и посевного материала.

Микроорганизмы можно выращивать:

- в ферментере периодического действия (микроорганизмы выращивают без добавления свежей культуральной среды);

- в ферментере периодического действия с добавлением субстрата (периодически добавляют увеличивающиеся количества питательных веществ, но культуральную среду не удаляют до конца процесса);
- в непрерывной культуре (свежая культуральная среда поступает в ферментер непрерывно, и параллельно отводится такой же объем клеточной суспензии).



**Рисунок 101** – Принципиальная схема глубинного культивирования микроорганизмов:

- 1 – смеситель питательной среды; 2 – стерилизатор в непрерывном режиме потока питательной среды; 3, 4 – теплообменники;  
 5 – посевные аппараты; 6, 7 – ферментер; 8, 9 – насосы;  
 10–12 – фильтры для очистки воздуха.

В ходе *периодической ферментации* различают *шесть* основных фаз роста:

- лаг-фазу (наблюдается, когда посевной материал получен из культуры, рост которой прекратился в результате истощения субстрата или ингибирования продуктом);
- фазу ускорения (скорость роста клеток увеличивается до достижения постоянной величины);
- логарифмическую (экспоненциальную) фазу (клетки претерпевают несколько делений, а удельная скорость роста остается постоянной);
- фазу замедления (кратковременная при истощении субстрата);
- стационарную фазу (биомасса остается постоянной, но метаболизм резко меняется – синтез вторичных метаболитов, например, антибиотиков);
- фазу отмирания (истощение энергетических запасов клетки и прекращение метаболизма). Кривую роста в логарифмической фазе опи-

ссылают математически. Прирост клеточной массы во времени  $dX/dt$  равен произведению удельной скорости роста  $\mu$  на биомассу  $X$ :

$$dX/dt = \mu X$$

Аналогично, прирост числа клеток  $dN/dt$  равен произведению удельной скорости  $\mu$  на число клеток  $N$ :

$$dN/dt = \mu N$$

Удельная скорость  $\mu$  зависит от концентрации лимитирующего субстрата (источника углерода или азота)  $S$ , максимальной удельной скорости роста  $\mu_{max}$  и субстратспецифичной константы  $K_s$ :

$$\mu = \mu_{max} S / (K_s + S).$$

где,  $S$ , и  $K_s$  имеют размерность г/л или моль.

Иногда вместо удельной скорости роста используют время удвоения, или время генерации  $t_d = \ln 2 / \mu$ . Это время, за которое в определенных условиях число клеток или биомасса удваиваются.

Для одноклеточных микроорганизмов величина  $\mu_{max}$  обычно находится в диапазоне  $2,1 - 0,086$  ч<sup>-1</sup>, что соответствует времени удвоения примерно от 20 мин до 8 ч. Когда субстрат присутствует в избытке (т.е. при  $S \gg K_s$ ),  $\mu = \mu_{max}$  и достигается максимальная скорость роста культуры в экспоненциальной фазе. Как правило, величина  $K_s$  настолько мала, что концентрация субстрата редко становится сравнимой с  $K_s$  во время экспоненциальной фазы. Например, в случае *E. coli*  $K_s$  для глюкозы равна примерно 1 мг/мл, а начальная концентрация глюкозы в среде обычно составляет около 10000 мг/л. Однако в конце экспоненциальной фазы субстрата остается мало, и  $S$  может стать ниже  $K_s$  (в этом случае быстро наступает фаза замедления).

Периодическая культура с добавлением субстрата – в ферментер периодически добавляют субстрат, а конечный продукт собирают только по завершении процесса. Добавление субстрата приводит к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз и к увеличению биомассы и количества метаболитов, синтезируемых во время стационарной фазы (например, антибиотиков). Однако в стационарной фазе микроорганизмы часто синтезируют протеолитические ферменты, разрушающие все производимые ими белки. Поэтому в случае получения белка как целевого продукта, следует остановить процесс до его перехода в стационарную фазу. Периодическую ферментацию с добавлением субстрата мож-

но использовать для культивирования не только микроорганизмов, но и клеток млекопитающих и насекомых.

При *непрерывной ферментации* стационарные условия обеспечиваются тем, что при постоянном объеме биореактора убыль числа клеток (удаление продукта) в точности уравнивается их увеличением в результате деления. Чтобы получить непрерывную культуру с постоянными гидродинамическими характеристиками, нужно создать условия, при которых удельная скорость роста была бы ниже максимальной величины  $\mu_{max}$ . Для этого нужна тщательная регулировка насоса подачи, чтобы объем культуры в биореакторе поддерживался постоянным. Получение продукта в ферментере непрерывного типа дешевле, чем в периодических из-за уменьшения объема биореактора, отсутствия простоя и сохранения физиологического статуса культивируемых клеток на одинаковом уровне. Непрерывная ферментация может продолжаться 500–1000 ч, что создает проблему поддержания стерильности промышленной установки.

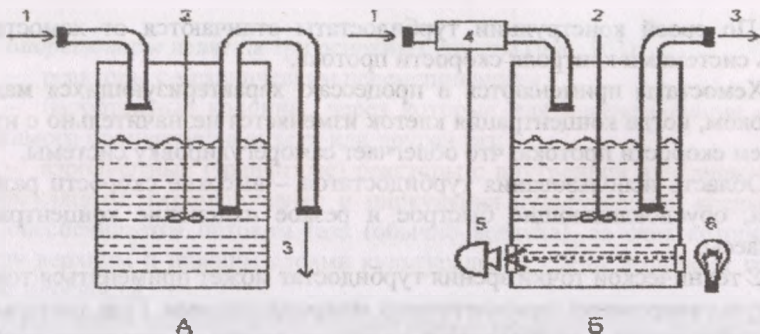
В таблице 9 приведены основные факторы среды, определяющие рост и биосинтетическую активность продуцентов.

**Таблица 9 – Факторы среды, определяющие функционирование продуцентов**

<b>Фактор</b>	<b>Роль при культивировании</b>	<b>Методы управления</b>
Состав и концентрация питательных веществ	Обеспечивают метаболизм	Составление оптимальной композиции; подпитка во время ферментации; непрерывность процесса; многостадийность с учетом потребностей продуцента по фазам развития и др.
Концентрация продукта и	Замедляет биохимические реакции	Осаждение продукта по мере накопления; ферментация с диализом; ферментация под разрежением с испарением летучего продукта и др.
pH	Оптимизирует скорости биохимических реакций (пределы pH 3,5–9,0)	Регулирование путем добавления кислоты или щелочи
Температура	Оптимизирует скорость биохимических реакций (20–70°C)	Охлаждение или подогрев культуральной жидкости при помощи теплообменников или температуры подаваемых в биореактор субстратов

Фактор	Роль при культивировании	Методы управления
Осмотическое давление или активность воды	Определяет границы жизни (0,6-0,998)	Составление сред с оптимальной концентрацией питательных веществ или влажностью твердой среды; поддержание на постоянном уровне во время ферментации путем разбавления водой или добавления отдельных компонентов
Содержание растворенного кислорода	Для аэробов обеспечивает аэробный метаболизм; является акцептором $H^+$ ; ингибирует развитие анаэробов	Для аэробных процессов регулируют интенсивностью аэрации или добавлением к газовой смеси кислорода; при атмосферном давлении и $20^{\circ}C$ в 1 л среды растворяется 0,28 ммоль (0,008 г/л) $O_2$ . Анаэробные процессы реализуют в бескислородной среде, что достигается продуванием $N_2$ и $CO_2$ или добавками восстановителей (цистеина, аскорбиновой кислоты и др.)
Содержание диоксида углерода	Равномерное распределение питательных веществ и биомассы по всему пространству среды	Организируют макро- и микроперемешивание в биореакторах при помощи механических мешалок, барботажных, циркуляционных и других систем. Аэрация способствует перемешиванию, а пенообразование – флотации продукта; флокуляция способствует осаждению
Вязкость среды	Определяет диффузию питательных веществ и перемешивание клеток продукта	Регулирование компонентами питания, характером и концентрацией биомассы, а также наличием некоторых полимерных экстрацеллюлярных продуктов. Вязкость влияет на перемешивание и аэрацию, для чего требуются специальные технические средства

Различают хемостатный и турбидостатный режимы непрерывного культивирования (рис. 102).



**Рисунок 102** – Схемы биореакторов для проточного культивирования микроорганизмов.

А – хемостат; Б – турбидостат с автоматической регуляцией оптической плотности. 1 – поступление среды, 2 – мешалка, 3 – сток культуры, 4 – насос, 5 – фотозлемент, 6 – источник света.

При *хемостатном режиме* культивирования саморегулируемая система возникает в силу следующих причин: если первоначальное поступление свежей питательной среды и вымывание биомассы превышает скорость деления клеток, то в результате разбавления культуры снижается концентрация веществ, ограничивающих ростовые процессы и скорость роста культуры повышается; увеличивающаяся популяция начинает активнее «выедать» субстрат, что в свою очередь приводит к торможению роста культуры. Конечным итогом этих процессов является (после серии затухающих колебаний) установление равновесия между скоростью роста культуры и ее разбавлением.

Биореактор, работающий в хемостатном режиме культивирования, называют *хемостатом*. Его конструкция предусматривает наличие:

- 1) приспособления для подачи питательной среды;
- 2) устройства, обеспечивающего отток культуральной жидкости вместе с клетками;
- 3) системы, контролирующей концентрацию элементов питательной среды и управляющей скоростью подачи питательной среды.

Последнее является наиболее важным и наиболее сложно осуществимым устройством.

*Турбидостатный режим* культивирования базируется на прямом контроле концентрации биомассы. Наиболее распространенным методом ее определения является измерение светорассеивания с помощью фотозлементов. Повышение концентрации клеток и соответственно оптической плотности автоматически ускоряет проток жидкости и наобо-

рот. По своей конструкции турбидостаты отличаются от хемостатов лишь системами контроля скорости потока.

Хемостаты применяются в процессах, характеризующихся малым протоком, когда концентрация клеток изменяется незначительно с изменением скорости потока, что облегчает саморегулировку системы.

Область использования турбидостатов – высокие скорости разбавления, обуславливающие быстрое и резкое изменение концентрации биомассы.

С технической точки зрения турбидостат может применяться только для культивирования одноклеточных микроорганизмов. При длительном культивировании в турбидостате возникает довольно серьезная проблема, связанная с прилипанием клеток к фотоэлементу.

Однако имеются и определенные преимущества. Так, например, если засеивается смешанная культура, то в турбидостате автоматически отбирается более быстро растущий вид, что может использоваться для предохранения от массивного заражения посторонней микрофлорой (если, конечно, она растет медленнее) и селекции определенных форм.

Непрерывное культивирование в одном биореакторе называется *одностадийным*.

*Многостадийное выращивание* предусматривает последовательное или каскадное расположение биореакторов, позволяющее обеспечивать внедрение принципа дифференцированных режимов в непрерывные биотехнологические процессы, основанные на создании системы биореакторов.

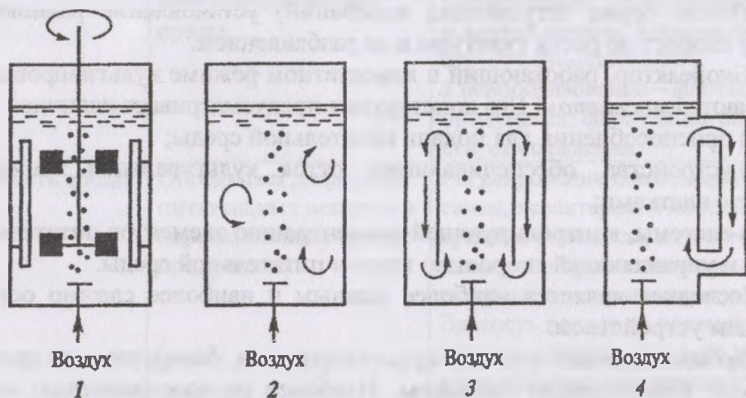


Рисунок 103 – Схема работы основных типов биореакторов:

- 1) биореактор с механическим перемешивающим устройством;
- 2) барботажный биореактор;
- 3) аэролифтный биореактор;
- 4) биореактор с вынесенной циркуляционной петлей

Биореакторы делят на три основных группы (рис. 103):

- реакторы с механическим перемешиванием;
- барботажные колонны, через которые для перемешивания содержимого пропускается воздух или другой газ;
- аэролифтные (эрлифтные) реакторы с внутренней или внешней рециркуляцией; перемешивание и циркуляция культуральной среды в них обеспечивается потоком газа (обычно воздуха), за счет которого между верхним и нижним слоями культуральной среды возникает градиент плотности.

Чаще всего используются биореакторы с механическим перемешиванием (рис. 104), поскольку они имеют следующие преимущества:

- позволяют легко менять технологические условия;
- всегда есть в продаже;
- обеспечивают эффективную доставку газа к растущим клеткам (если говорить на инженерном языке, обладают высоким объемным коэффициентом массообмена);
- имеется большой опыт их промышленного использования с соответствующей регламентационной литературой.

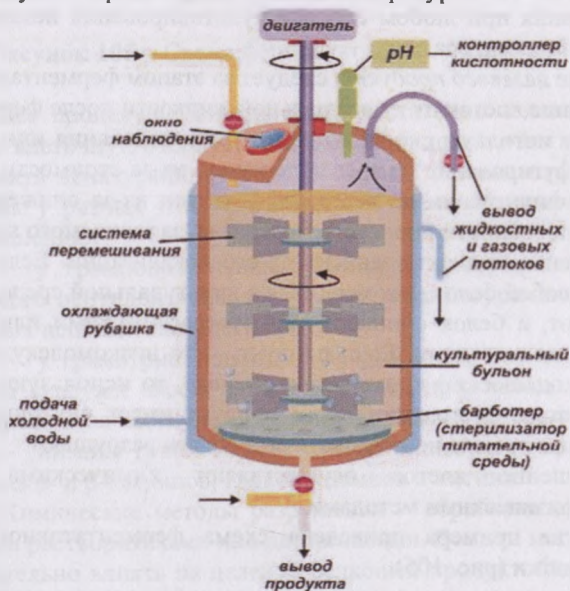


Рисунок 104 – Устройство ферментера с механическим перемешиванием для культивирования бактериальных клеток

В реакторах с механическим перемешиванием газ (как правило, воздух) подают в культуральную среду под давлением через разбрызгиватель – кольцо с множеством маленьких отверстий либо трубку с одним отверстием. В первом случае образуются мелкие пузырьки воздуха и обеспечивается их более равномерное распределение, однако разбрызгиватели в виде трубок используются чаще, поскольку они реже закупориваются. Для равномерного распределения газа по всему объему биореактора используются мешалки – одна или несколько. Они разбивают крупные пузырьки воздуха, разносят их по всему реактору и увеличивают время пребывания в культуральной среде. Многие культуральные среды агрессивны, поэтому стенки биореакторов делают из нержавеющей стали. Стекланные части используют только в лабораторных биореакторах емкостью менее 50 л. Размер биореактора лимитируется его способностью эффективно отдавать тепло, выделяемое микроорганизмами в ходе метаболизма и высвобождаемое в результате перемешивания. Известно, что ассимилируя 1 кг сахара, микроорганизмы выделяют 4–6 тысяч кДж тепла.

Обеспечение стерильности, постоянства pH и температуры – ключевые требования при любом способе культивирования независимо от конструкции биореактора.

*Выделение целевого продукта* следует за этапом ферментации.

1. Отделение клеток от культуральной жидкости после ферментации осуществляют методами скоростного центрифугирования или фильтрацией. Центрифугирование не всегда доступно из-за стоимости оборудования; метод фильтрации не всегда эффективен из-за снижения фильтрационной способности пористого материала, заполняемого клетками.

2. Выделение продукта зависит от его локализации. Если продукт представляет собой белок, находящийся в культуральной среде, то среду концентрируют, а белок очищают хроматографическими или другими препаративными методами. Если продукт – это низкомолекулярное соединение, находящееся в культуральной среде, то используют соответствующие методы экстракции. Если продукт имеет внутриклеточную локализацию, то прежде чем очищать его, клетки разрушают.

3. Разрушение клеток осуществляют химическими, биологическими и физическими методами.

В качестве примера приведена схема ферментативного лизиса дрожжевой клетки (рис. 105).

При проведении лизиса в гипертонической среде и высокой активности литических ферментов клеточная стенка может быть полностью лизирована, и из клетки образуется протопласт, принимающий затем

сферическую форму. При перенесении в гипотоническую среду сферопласты мгновенно лизируются под действием осмотических сил.

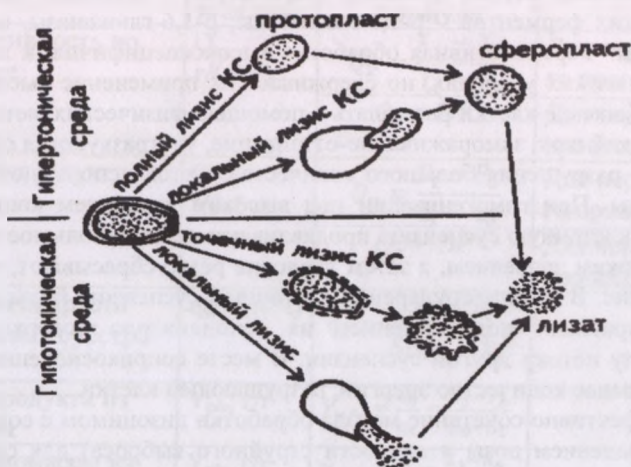


Рисунок 105 – Схема ферментативного лизиса дрожжевой клетки

Все процедуры должны быть достаточно жесткими, чтобы разрушить клеточную стенку, и в то же время достаточно мягкими, чтобы исключить денатурацию белка. В связи с разным строением клеточных стенок у разных микроорганизмов существуют разные подходы к их разрушению:

- у грамположительных бактерий клеточная стенка состоит из толстого пептидогликанового слоя N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных пептидными мостиками;
- у грамотрицательных бактерий клеточная стенка тоньше и покрыта снаружи слоем липидов (стенка дрожжевых клеток состоит из плотного слоя частично фосфорилированных маннанов и  $\beta$ -гликанов);
- низшие грибы имеют многослойные клеточные стенки, состоящие из  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликанов, гликопротеинов и хитина.

Химические методы разрушения – обработка щелочью, органическими растворителями или детергентами. Все эти методы не должны отрицательно влиять на целевой белковый продукт. Основной биологический метод разрушения клеток микроорганизмов является лизис с помощью ферментов. Лизоцим яичного белка легко гидролизует клеточные стенки грамположительных бактерий, для лизиса грамотрицатель-

ных бактерий к яичному лизоциму добавляют этилендиаминотетрауксусную кислоту (ЭДТА, трилон Б).

Клеточные стенки дрожжей гидролизуют с помощью одного или нескольких ферментов –  $\beta$ -1,3-глюканазы,  $\beta$ -1,6-глюканазы, манназы и хитиназы. Ферментативная обработка высокоспецифична, а лизис проходит в мягких условиях, но сдерживает их применение высокая стоимость. Дешевле клетки разрушать с помощью физических методов – осмотический шок, замораживание-оттаивание, ультразвуковая обработка.

Для разрушения большого количества клеток используют шаровые мельницы. При гомогенизации под высоким давлением концентрированную клеточную суспензию продавливают через небольшое отверстие под высоким давлением, а затем давление резко сбрасывают, что вызывает лизис. В методе соударения клеточную суспензию большой вязкости направляют под давлением на неподвижную поверхность или навстречу потоку другой суспензии. В месте соприкосновения выделяется большое количество энергии, разрушающей клетки.

Эффективно сочетание метода обработки лизоцимом с соударением (с уменьшением дозы и скорости струйного выброса) для сохранения нативности целевого продукта. Затем следуют этапы очистки белка, а если получен нерастворимый продукт, то его солубилизации обычными приемами препаративной биохимии.

*Оценка процесса ферментации* осуществляется путем анализа ряда кинетических показателей. Практически в ферментационной среде контролируют содержание основных субстратов (обычно источник углеводов), биомассы и целевого продукта. По этим показателям вычисляют удельную скорость роста, продуктивность системы по биомассе и продукту, а также экономические коэффициенты (таблица 10).

**Таблица 10** – Основные показатели процесса ферментации

Показатель	Символ и ед.изм.	Расчетная формула	Примечание
Концентрация биомассы:	X, г/л	$X_1 = X_0 e^{\mu(t_1 - t_0)}$	Для логарифмической фазы роста $e=2,718$
субстрата	S, г/л		
продукта	P, г/л		
Удельная скорость	1/ч	$\mu = \frac{X_1 - X_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	-
Коэффициент разбавления	D, 1/ч	D = $\mu$	Для непрерывного процесса

Показатель	Символ и ед.изм.	Расчетная формула	Примечание
Продуктивность по биомассе	$Q_x$ , г/(л*ч)	$Q_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}$	Для периодического процесса
		$Q_x = DX$	Для непрерывного процесса
То же по продукту	$Q_p$ , г/(л*ч)	$Q_p = \frac{P_1 - P_0}{t_1 - t_0}$	Для периодического процесса
		$Q_p = DP$	Для непрерывного процесса
Удельная скорость потребления субстрата	$q_s$ , г/(л*ч)	$q_s = \frac{S_1 - S_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	-
Выход продукта из субстрата	$Y_{p/s}$ , г/г	$Y_{p/s} = \frac{q_p}{q_s} = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1}$	-
Выход биомассы из субстрата	$Y_{x/s}$ , г/г	$Y_{x/s} = \frac{\mu}{q_s} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S_1}$	-
Удельная скорость образования продукта	$q_p$ , г/(г*ч)	$q_p = \frac{P_1 - P_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	-

### Биотехнологические штаммы микроорганизмов

Микроорганизмы, способные синтезировать определенный продукт в количествах, превосходящих физиологические потребности (сверхсинтез), часто встречаются в природе. Некоторые из них при выделении в окружающую среду оказываются токсичными для других видов (органические кислоты, спирты, антибактериальные вещества) и служат средством защиты. Микроорганизмы с такими свойствами были первыми привлечены к хозяйственной деятельности человека.

В настоящее время природные штаммы микроорганизмов используют для производства микробной биомассы (микробного белка), бактериальных азотистых удобрений, биопестицидов, пищевых продуктов. Однако большинство промышленных микроорганизмов представлено искусственно селектированными штаммами.

Таким образом, в промышленности применяют три вида штаммов: природные штаммы, улучшенные естественным или искусственным отбором; штаммы, измененные в результате индуцированных мутаций, и штаммы культур, полученные методами генной или клеточ-

ной инженерии. В таблице 11 представлены некоторые группы микроорганизмов, используемые для промышленного синтеза веществ.

**Таблица 11** – группы микроорганизмов, используемые для промышленного биосинтеза

ПРОДУЦЕНТ	ПРОДУКТ
Дрожжи	
<i>saccharomyces cerevisiae</i>	этанол, глицерин
<i>kluveromyces fragilis</i>	этанол
<i>kl.lactis</i>	этанол
<i>schizosaccharomyces pombe</i>	этанол
<i>candida lipolytica</i>	лимонная, изолимонная, пировиноградная кислоты
Бактерии	
<i>clostridium acetobutylicum</i>	ацетон, бутанол
<i>cl.thermohydrosulfuricum</i>	этанол, уксусная, молочная кислоты
<i>cl.thermosaccharolyticum</i>	глюкоза, ксилоза, этанол
<i>cl.auranticum</i>	изопропанол
<i>cl.thermoacticum</i>	уксусная кислота
<i>cl.propionicum</i>	пропионовая, акриловая кислоты
<i>xanthomonas campestris</i>	полисахариды
<i>zymomonas mobilis</i>	этанол, сорбит, глюконовая кислота, леван
<i>thermoanarobacter ethanolicus</i>	этанол, уксусная, молочная кислоты
<i>dunaliella sp.</i>	глицерин
<i>aerobacter aerogenes</i>	2,3-бутандиол
<i>bacillus polymixa</i>	2,3-бутандиол
<i>acetobacter curvum</i>	молочная кислота
	уксусная кислота
микровицеты (плесневые грибы)	
<i>aspergillus niger</i>	лимонная, щавелевая кислоты
<i>as.terreus</i>	итаконовая кислота
<i>as.oryzae</i>	ферментные препараты (амилаза)
<i>as.awamori</i>	ферментные препараты (пектиназа)

**Контрольные вопросы:**

- 1 Опишите основные стадии и показатели роста микроорганизмов.
- 2 Охарактеризуйте основное назначение и устройство разных типов биореакторов.
- 3 Какие способы ферментации вам известны?
- 4 Как вычисляют удельную скорость роста популяции микроорганизмов?
- 5 Как определяют продуктивность системы по биомассе и продукту?

## **ТЕМА 14. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОТРАСЛЯХ НАРОДНОГО ХОЗЯЙСТВА**

### **Производство пищевых продуктов и напитков**

Современный мировой рынок пищевых ингредиентов оценивается в 24 млрд дол. США; предполагают, что в 2015 г. его объем возрастет до 28 млрд дол. США. Рынок подразделяется на следующие сегменты: ароматизаторы (28 %), усилители вкуса и аромата (14 %), регуляторы кислотности (12 %), сахарозаменители (9 %), крахмал и желатин (7 %). Для сравнения, в настоящее время российский рынок пищевых ингредиентов оценивается в примерно в 2 млрд дол. США при вероятном росте на 30 % к 2015 г. На 90 % российский рынок пищевых ингредиентов формируется за счет импортных поставок. Мировой рынок лечебного питания оценивается в 18 млрд дол. США. Этот сегмент динамично развивается в мире, и к 2015 г. объем продаж может составить более 27 млрд дол. США. В России объем продаж лечебного и функционального питания (включая детское) не превышает 16,8 млрд рублей (550 млн дол. США) и может вырасти к 2015 г. на 27 % (до 700 млн дол. США).

В производстве пищевых продуктов микроорганизмы играют разную роль: они используются для получения ферментов или иных метаболитов, с их помощью сбраживается сырье, а некоторые грибы и бактерии выращиваются для непосредственного употребления. В пищевой биотехнологии применяются как чистые культуры микроорганизмов, так и дикие сообщества грибов и бактерий, живущие на плодах и фруктах и постоянно находящиеся в сырье, которые при создании определенных условий могут размножиться. Последний способ характерен для традиционных бродильных производств, появившихся задолго до открытия микробов. В современном промышленном производстве выбору штамма микроорганизма уделяется особое внимание и чистота культуры строго контролируется.

### **Молочные продукты**

Ферментация молока применяется для получения разнообразных молочных продуктов. В сквашивании молока, при котором лактоза превращается в молочную кислоту, участвуют стрептококки и молочнокислые бактерии. С помощью реакций, сопутствующих основному процессу, получают сыры, сметану, йогурты, пахту и другие продукты переработки молока. При этом специфические свойства и вкус отдельных про-

дуктов и их сортов зависят от микроорганизмов, ферменты которых участвуют в образовании побочных продуктов молочнокислого брожения: пептидов, аминокислот, жирных кислот, спиртов.

При ферментации молока протекают шесть основных реакций, в результате которых образуются молочная, пропионовая, лимонная или масляная кислоты, спирт, а также может происходить колиформное газообразование. Главная из этих реакций – образование молочной кислоты. На ней основаны все способы ферментации молока. Под действием фермента микроорганизмов (лактазы или галактозидазы) лактоза молока гидролизуется с образованием галактозы и глюкозы. Затем галактоза превращается в глюкозу, а глюкоза – в молочную кислоту. Накопление молочной кислоты создает кислую среду, необходимую для образования сгустка казеина. Этот процесс происходит при достижении изoeлектрической точки казеина (рН 4,6) и лежит в основе сыроварения. В производстве кефира используется природная ассоциация микроорганизмов «кефирный грибок», в состав которого входят лактобактерии и дрожжи, поэтому кефир является продуктом смешанного молочнокислого и спиртового брожения.

Маслянокислое брожение с образованием углекислого газа играет ключевую роль в производстве швейцарского сыра. Характерный вкус сметаны и сливочного масла формируется в результате лимоннокислого брожения. Раньше эти продукты получали за счет действия бактерий, содержащихся в молоке. В настоящее время используют закваски, позволяющие получать молочные продукты нужного качества и типа.

Одними из древнейших молочных продуктов являются сыры. Они бывают мягкими, содержащими 50–60 % воды, и твердыми, с содержанием воды 13–34 %. При чрезвычайном многообразии сыров в процессе их выработки имеются общие этапы: подготовка культуры молочнокислых бактерий и засев ею молока; створаживание с помощью сычужного фермента ренина, получаемого из желудка теленка; термообработка, прессование и созревание. В связи с дороговизной и дефицитом источника ренина его часто заменяют протеолитическими ферментами из грибов. Однако, наиболее рациональное решение этой проблемы – выработка ренина методом генной инженерии. Для ускорения созревания сыра применяют также и другие ферменты животного и микробного происхождения (липазы, панкреатин, пептидазы и протеазы грибов).

В связи с тем, что у определенного процента детей и взрослых наблюдается недостаточность кишечной лактазы, расщепляющей молочный сахар, выпускается безлактозное молоко, обработанное галактозидазой, ферментом, который получают из дрожжей, плесеней и бактерий.

## Пробиотики

Биотехнологические процессы применяются в технологии производства пробиотиков. Пробиотики являются экологически чистыми препаратами, применяются для профилактики желудочно-кишечных заболеваний, восстановления кишечного биоценоза при стрессах, антибиотикотерапии, не оказывают побочного эффекта при длительном и регулярном их применении. Учеными изучены возможные механизмы действия пробиотиков, которые влияют на подавление роста живых патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, микробный антагонизм, стимуляцию иммунитета. Эффективность применения различных пробиотиков широко варьирует и зависит от многих факторов, в том числе от видового состава входящих в них микроорганизмов. Большинство известных в мировой практике пробиотиков содержит несколько видов бактерий-симбионтов, сочетание биологических свойств которых позволяет повысить эффективность препаратов. К числу наиболее известных относятся молочнокислые бактерии, бифидобактерии, стрептококки. В ряде стран в составе пробиотиков для животных широко используют дрожжи рода *Sacharomyces* и *Candida*, плесневые грибы рода *Aspergillus*.

## Хлеб

Биотехнологические процессы занимают важное место в выпечке хлеба. Для этого используются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. При сбраживании глюкозы и мальтозы муки образуются пузырьки углекислого газа, что придает хлебу пышность и мягкость. При дальнейшей термической обработке происходит желатинизация крахмала, погибают дрожжи, а тесто частично обезвоживается. В результате получается легкоусвояемый питательный продукт с легкой ячеистой структурой. Образующиеся при анаэробном брожении органические кислоты, спирты и эфиры участвуют в формировании вкуса хлеба. Для выпечки ржаного хлеба «с кислинкой» при замесе в тесто вносят опару, представляющую собой смесь ржаной муки и воды, заквашенную смешанной культурой лактобацилл.

## Продукты гидролиза крахмала

Крахмал из кукурузы, пшеницы или картофеля гидролизуют кислотным, кислотно-ферментативным или ферментативным методами. Ферментативный гидролиз осуществляют  $\alpha$ -амилазой из *B. subtilis* и

амилогликозидазой из *A. oryzae* и из *A. niger*. Преимущество ферментативного гидролиза заключается в том, что значительно увеличивается скорость процесса, уменьшается загрязнение продуктов побочными веществами, а получаемый продукт характеризуется высоким декстрозным эквивалентом (ДЭ). Величина ДЭ отражает глубину гидролиза, при этом ДЭ глюкозы (декстрозы) соответствует 100 единицам, а крахмала – нулю. Благодаря внедрению в производство термостабильных амилаз первая стадия гидролиза крахмала (ожижение) происходит при высокой температуре с получением охиженного крахмала, т. е. смеси декстринов (ДЭ = 6–8). Крахмал с ДЭ = 12–14 (сахар с малым ДЭ) называется конвертированным. Следующая стадия (осахаривание) проводится с помощью  $\alpha$ -амилаз, пулланазы. В результате образуется мальтозный сироп (сахар с ДЭ = 42). Далее, при участии амилогликозидазы, получают сахарный сироп с ДЭ = 63, а затем – декстрозный сироп с ДЭ = 94–96. После очистки, изомеризации и хроматографического разделения из сиропа получают глюкозу, фруктозу и глюкозо-фруктозные сиропы, применяющиеся в промышленности.

### Производство алкогольных напитков

В конце XIX века Луи Пастер впервые установил, что превращение сахара в спирт и углекислый газ без доступа кислорода, т. е. брожение, осуществляется живыми клетками дрожжей. В дальнейшем для изготовления алкогольных напитков отобрали дрожжи рода *Saccharomyces*, сбраживающие сахаросодержащее сырье, которые культивируют и используют в виде чистых культур. В качестве питательного субстрата применяются природные сахара, содержащиеся в винограде и других фруктах, или получаемые из крахмала и крахмалосодержащего сырья.

В зависимости от используемого сырья и закваски путем брожения производят винные или пивные напитки. Особенностью производства вина является то, что оно основано на использовании диких местных дрожжей. Для подавления роста сторонних микроорганизмов сырье обрабатывали сернистым газом. Однако, в настоящее время все большее применение находят дрожжевые закваски, особенно в странах, не являвшихся традиционно винодельческими. Внедряются в производство вин также иммобилизованные ферменты. Сырьем для выработки большинства вин служат винные сорта винограда одного вида *Vitis vinifera*. Белые вина получают из чистого виноградного сока, рН их обычно ниже, чем красных. Для выработки красных вин косточки и кожицу винограда оставляют в виноградном сусле (мусте) до конца брожения. На вкус вина влияют содержащиеся в винограде терпеновые вещества: ли-

налоол, гераниол и другие. Производство пива является сложным многоэтапным процессом. Для этого используют, как правило, ячмень, а также другие крахмалсодержащие злаки. Поскольку крахмал не сбраживается пивными дрожжами, из ячменя путем ферментативного гидролиза крахмала получают сусло, содержащее необходимые для дрожжей сахара.

Биотехнологические исследования в области пивоварения направлены на отбор и создание штаммов дрожжей, обладающих высокой продуктивностью и способных давать напитки с заданными свойствами. Все шире применяются также ферментные препараты, ускоряющие процесс пивоварения и снижающие расход сырья благодаря более глубокому его расщеплению.

### Биотехнологическое производство органических кислот

Исторически наиболее ранними и широко распространенными способами биотехнологии являются *бродительные процессы*. В основе процесса брожения лежит анаэробное окисление глюкозы до пировиноградной кислоты, которая в отсутствие кислорода не превращается в ацетил-КоА, а восстанавливается до молочной или пропионовой кислоты или декарбоксилируется до уксусного альдегида. В зависимости от вида микроорганизма образуются разные конечные продукты. По наибольшему содержанию того или иного продукта различают спиртовое, молочнокислое, пропионовокислое или маслянокислое брожение.

Среди органических кислот первое место по объему производства занимает уксусная кислота. В технических целях ее получают химически путем синтеза из этилена или выделением из продуктов сухой перегонки древесины. Полученная таким способом кислота называется ледяной, ее концентрация составляет 77–80%. Техническая уксусная кислота используется для производства пластмасс, каучука, волокон и инсектицидов. Для пищевых целей уксусную кислоту производят путем микробиологического окисления этанола. Она является важнейшим продуктом микробиологической промышленности. Окисление этанола происходит при участии уксуснокислых бактерий, относящихся к родам *Acetobacter* и *Gluconobacter*. В естественных условиях уксуснокислые бактерии находятся на овощах, фруктах, в скисших фруктовых соках и слабых алкогольных напитках.

В качестве приправы, а также для изготовления майонеза, горчицы, маринадов, соусов, хрена используют 4–9 %-й уксус. Такую концентрацию можно приготовить из ледяной уксусной кислоты, разбавив ее в 10–20 раз, но полученный раствор не будет обладать вкусовыми качествами

пищевого уксуса. Причина в том, что при получении уксуса из фруктовых сиропов, вин, ягод или фруктов он при хранении созревает за счет образования эфиров уксусной кислоты с другими органическими соединениями, приобретая специфический вкус и аромат, что повышает его потребительские качества.

Производство лимонной кислоты методом ферментации при участии микроскопических грибов было налажено в конце XIX века. До настоящего времени основным ее продуцентом является плесневый гриб *Aspergillus niger*. До 30-х годов XX века лимонную кислоту получали путем поверхностного культивирования гриба, а начиная с 40-х годов применяют в основном глубинное культивирование в герметичных ферментаторах. Используя высокопродуктивные штаммы *A. niger*, добиваются 98–99% выхода кислоты в расчете на израсходованную сахарозу.

Лимонная кислота имеет приятный кислый вкус и хорошо растворима в воде. Ее широко используют в пищевой промышленности, преимущественно в производстве напитков, а также в фармацевтической и косметической промышленности. Эфиры лимонной кислоты применяются в производстве пластмасс. Хелатирующие свойства лимонной кислоты используются для связывания и очистки металлов. Ее вводят также в состав detergentных (поверхностно-активных веществ). Будучи природным мегаболитом, лимонная кислота легко разрушается всеми живыми организмами, поэтому она нетоксична и не загрязняет окружающую среду.

Яблочную кислоту, можно получать из *n*-парафинов с помощью дрожжей рода *Candida*, из этанола путем ферментации при участии бактерий, а также из фумаровой кислоты с использованием иммобилизованной фумаразы. Яблочную кислоту используют в пищевой промышленности в качестве подкислителя.

### Биосинтез азотсодержащих веществ

Биосинтез аминокислот биотехнологическими методами занимает ведущее положение по сравнению с химическими, так как при химическом синтезе образуется рацемическая смесь оптических изомеров аминокислот, а биохимическим путем синтезируются природные *L*-изомеры аминокислот. Мировое производство аминокислот составляет более 500 т в год, из них особую роль играют глутаминовая кислота и лизин.

Микробиологическое получение аминокислот затрудняется тем, что накапливающиеся аминокислоты тормозят (ингибируют) собственный синтез по принципу обратной отрицательной связи. Поэтому в качестве продуцентов аминокислот отбирают мутантные штаммы микроорганизмов

с нарушенными механизмами регуляции обмена веществ. В качестве питательной среды используются гидролизаты крахмала, меласса сахарного тростника и свеклы, глюкоза, метанол, а также промежуточные метаболиты природного синтеза аминокислот, или одни аминокислоты (заменимые) для получения других (незаменимых) при обязательном участии витаминов, в том числе биотина. Источником азота служат соли аммония. Наиболее экономически выгодным и управляемым является биосинтез аминокислот с помощью иммобилизованных микроорганизмов. Таким путем получают, например, аспарагиновую кислоту из фумаровой иммобилизованными клетками кишечной палочки (*E. coli*).

Аминокислоты находят применение в различных целях. Они используются для обогащения кормов. Лизин, триптофан и треонин добавляют в пищевые продукты, содержащие растительные белки, в которых этих аминокислот не хватает. Метионин добавляют в продукты, приготовленные из сои. Натриевая соль глутаминовой кислоты обладает выработанным мясным вкусом, поэтому ее производят и используют в качестве усилителя вкуса. Глицин, обладающий сладким вкусом, применяют в качестве подсластителя, а также как бактериостатическое средство. В медицине растворы аминокислот применяют для парентерального (внутривенного) питания и для лечения некоторых заболеваний. В химической промышленности аминокислоты используются для производства детергентов, синтетических волокон и пленок, а также для получения некоторых химикатов, применяемых в сельском хозяйстве.

*Биотехнологическим путем* получают многие витамины. Среди них ретинол (А), рибофлавин (В<sub>2</sub>), цианкобаламин (В<sub>12</sub>), аскорбиновая кислота (С), эргокальциферол (D<sub>2</sub>) и другие. Для их производства используют различные бактерии, дрожжевые и плесневые грибы. В зависимости от вида микроорганизма и получаемого витамина питательной средой могут служить кукурузно-соевая мука, растительные масла, керосин, метанол, глюкоза, сахароза и их комбинации с добавлением минеральных солей.

Витамины применяются в медицине, в животноводстве и в пищевой промышленности. Среди них все большее применение в производстве пищевых продуктов находит витамин С, обладающий окислительно-восстановительными свойствами и являющийся природным антиоксидантом. Аскорбиновая кислота, ее изомеры и соли используются для стабилизации цвета мясных изделий и снижения содержания нитратов в них, для повышения всхожести теста при выпечке хлеба, с целью увеличения срока хранения пива, а также при изготовлении соков и нектаров.

Антибиотики являются группой веществ микробного происхождения, которые способны тормозить рост и размножение бактерий. Они

применяются в медицине, ветеринарии, а также для борьбы с болезнями растений. Первый антибиотик – пенициллин – впервые был получен в 1940 г. А. Флемингом, Х. Флори и Е. Чейном из культуральной жидкости нитчатого гриба *Penicillium notatum*.

В настоящее время продуцентами антибиотиков служат различные микроорганизмы, которые отбираются путем систематического скрининга. Большинство антибиотиков получают с помощью полусинтетических методов, заменяя атомы водорода в веществе, выделенном из микроорганизмов, на различные радикалы.

Микроорганизмы и выделенные из них ферменты применяются для направленной химической модификации молекул органических веществ. Примером этому служит синтез стероидных гормонов, применяемых для лечения различных заболеваний. Будучи сходными по своей структуре и различаясь наличием или расположением гидроксильных групп, метильных радикалов, двойных связей, гормоны и их производные проявляют специфическое биологическое и лечебное действие. Введение гидроксильных групп, алкильных радикалов или окисление молекул предшественников с образованием оксогрупп и двойных связей с помощью целых клеток микроорганизмов или иммобилизованных микробных ферментов приводит к сокращению этапов синтеза в десятки раз и к удешевлению продукта в сотни раз. Этот подход используется в промышленном производстве противовоспалительного стероидного гормона гидрокортизона, мужского полового гормона тестостерона, его аналогов, обладающих анаболическим действием и других лекарственных средств.

Некоторые грибы способны вырабатывать регуляторы и стимуляторы роста растений – растительные гормоны. Наиболее эффективные из них, гиббереллины, – сложные химические соединения, производные гибберелловой кислоты, выделяемой микроскопическим грибом *Gibberella fujikuroi*. Из других микроорганизмов, продуцирующих фитогормоны, получают такие стимуляторы роста сельскохозяйственных растений, как фузизокцин, абсцизовая кислота и котиленин. Гормоны растений и животных проявляют свою активность в дозах, составляющих миллионные доли грамма, поэтому их применение является экономически выгодным, а биотехнологическое производство – высокорентабельным.

### **Биотехнологическое производство белков**

Дефицит кормовых и пищевых белков, особенно в странах с недостаточно развитой экономикой, усугубляющийся бурным ростом наро-

донаселения, поставил задачу поиска нетрадиционных способов получения белка и белковых продуктов. Попытки синтеза высокомолекулярных белков химическим путем, предпринятые еще в конце XIX века, не увенчались успехом, поэтому в настоящее время синтезируют лишь некоторые пептиды, состоящие из остатков нескольких аминокислот.

Следующая причина развития биотехнологии белков объясняется все возрастающей потребностью медицины в относительно недорогих профилактических и лекарственных препаратах и диагностических средствах, имеющих белковое строение (инсулин и соматотропный гормон, вакцины, сыворотки и моноклональные антитела).

И, наконец, современные технологии производства продуктов промышленного и бытового назначения (полимеры, моющие средства, пищевые продукты и добавки, лекарства и т. д.) нуждаются в высокоэффективных и специфических катализаторах – ферментах, имеющих белковое строение.

Начиная с XIX века в пищу стали использовать пивные дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), содержащие в среднем 52 % белка. Впервые промышленное производство дрожжей рода *Candida* для пищевых целей было осуществлено в Германии. Добавление их в продукты питания во время Первой и Второй мировых войн позволило предотвратить белковое голодание населения этой страны.

В настоящее время белковые продукты получают из биомассы культур различных микроорганизмов, выращиваемых на этаноле, метаноле, метане, парафинах, крахмале и другом углеводном сырье. Питательным субстратом для роста микробов могут служить отходы деревообрабатывающей, сельскохозяйственной и нефтегазовой промышленности, а источником азота – аммиак или аммонийные соли. Получаемые продукты используются преимущественно в качестве кормовых добавок животным. В 1980 г. в Великобритании был впервые официально разрешен для употребления в пищу белок из гриба *Fusarium graminearum* (микопротейн), выращенного на глюкозе с добавкой неорганического азота. В то же время фирма *Hoechst* также начала производить продукт из бактерий, растущих на метаноле, который содержит 90 % белка.

Экономическая эффективность производства микробного белка объясняется тем, что микроорганизмы, способные расти на дешевых питательных средах, в качестве которых используются главным образом промышленные отходы, содержат в своем составе от 19 до 90 % белка. При этом выход белка в расчете на израсходованный питательный субстрат значительно выше, чем при выращивании сельскохозяйственных животных. Так, на 1 кг корма можно получить 68 г говядины (14 г белка), 200 г свинины (41 г белка) или 240 г куриного мяса (49 г белка), в то

время как из *F. graminearum* на 1 кг углеводов с добавкой неорганического азота получают более 1 кг сырой клеточной массы (136 г белка). Кроме того, микробная биомасса содержит незаменимые аминокислоты и высокие концентрации витаминов, что обуславливает дополнительную кормовую ценность продуктов.

### Получение и промышленное использование ферментов

Все биохимические реакции, протекающие в живых организмах, катализируются ферментами, являющимися по своему строению белками, содержащиеся в клетках и внеклеточных жидкостях микроорганизмов, растений и животных. Они участвуют в расщеплении белков, липидов и полисахаридов в желудочно-кишечном тракте, в реакциях внутриклеточного обмена веществ, в образовании и выведении из организма конечных продуктов обмена, в энергетических процессах, в обезвреживании токсических веществ, в синтезе клеточных белков и других биогенных соединений, необходимых для жизнедеятельности.

Ферментативные процессы применяются с доисторических времен во всех сферах деятельности человека. Виноделие и пивоварение, сыроварение и получение соевых продуктов, лечение нарушений пищеварения и выделка кож – наиболее характерные примеры использования ферментов.

Источниками ферментов служат ткани растений, животных и культуры микроорганизмов. Так, трипсин, вырабатываемый в поджелудочной железе человека и животных, а также комплекс протеолитических ферментов поджелудочной железы (панкреатин) применяются при болезнях органов пищеварения и в переработке мясных продуктов. Сычужный фермент (ренин), содержащийся в слизистой оболочке желудка телят, необходим для выработки сыра.

Из растений получают ферменты, расщепляющие белки (протеазы), которые используются в мясоперерабатывающей промышленности. Применение ферментов в химических и пищевых технологиях обусловлено их специфичностью, а также высокой активностью при проведении реакций в мягких условиях и отсутствием побочных продуктов реакций.

Началом промышленной энзимологии считается 1890 г., когда было освоено производство амилазы из гриба *Aspergillus oryzae*, расщепляющей  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи в крахмале. Препарат под названием такадиастаза, содержащий, наряду с амилазой примесь протеазы, применялся в качестве средства, улучшающего пищеварение.

Производство и использование ферментов в промышленных целях началось в XX в. В 1913 г. в странах Западной Европы получило приме-

нение средство для замачивания белья, содержащее соду и протеолитические ферменты поджелудочной железы: трипсин и химотрипсин. Подлинным переворотом в прачечной технологии, в середине XX века, явилось использование протеазы, получаемой из *Bacillus subtilis*, для замачивания и стирки белья. Добавление к стиральному порошку 0,5 % ферментного препарата, содержащего всего 3 % активного фермента, позволяет решить проблему отстирывания белковых пятен, так как протеаза с высоким сродством концентрируется именно на белковых пятнах. Со второй половины XX в. производятся сотни тонн очищенных ферментов различного назначения. Около половины получаемых ферментных препаратов приходится на протеазы. Постоянно расширяются их ассортимент и сфера применения. Протеазы используются для умягчения мяса и увеличения выхода качественных мясных продуктов, створаживания молока и производства новых молочных продуктов, для предотвращения холодого помутнения пива и расщепления клейковины муки, а также для получения белковых гидролизатов и смесей аминокислот пищевого и медицинского назначения. По строению активного центра протеазы делят на тиоловые, сериновые, кислые и металлоферменты.

Ряд *тиоловых ферментов*, применяемых для повышения физико-химических и качественных показателей мясных изделий, выделяют из растительного сырья. К ним относятся папаин из плодов дынного дерева, бромелаин из стеблей и листьев ананаса и фицин из растений рода *Ficus*. Эти ферменты отличаются дороговизной, поскольку их продуцентами являются тропические растения. Вследствие этого в мясное производство все больше внедряются кислые протеазы, синтезируемые грибами, и похожие по свойствам на пепсин и ренин.

*Кислые протеазы* применяются и в других отраслях пищевой промышленности. В частности, в хлебопекарном производстве – для расщепления клейковины муки с целью получения мягкого эластичного теста, идущего на изготовление бисквитов. В пивоварении они используются для предотвращения помутнения пива при охлаждении. Кислые протеазы створаживают молоко, но они не могут заменить ренин при выработке сыра, так как вызывают глубокий гидролиз казеина; тем не менее, некоторые из них используются для створаживания молока и производства некоторых сортов сыра. В странах Индокитая с их помощью гидролизуют белки сои и готовят соевые соусы. Кислые протеазы применяются также в кожевенной промышленности для удаления шерсти и выделки мягких, эластичных кож.

*Сериновые протеазы*, характеризующиеся низкой специфичностью, чаще всего используют в качестве действующего начала в стиральных порошках. Из них в наибольших количествах (более 500 т в год) выраба-

тывается субтилизин *Carlsberg*. Разработаны технологии получения сериновых протеаз из алкилофильных микроорганизмов, которые активны при pH 9–12 и температуре выше 50°C.

Отличительной особенностью сериновых протеаз является то, что они не гидролизуют белки до отдельных аминокислот. Ограничением для их применения в пивоварении является то, что они инактивируются сериновым ингибитором солода.

Более высокой избирательностью действия по сравнению с сериновыми протеазами обладают *металлоферменты*, в активном центре которых обычно содержится цинк. Они используются для различных целей наряду с бромелаином и папаином, в том числе для гидролиза белков ячменя при осветлении пива.

Для выделки сыра необходима специфичная протеаза (ренин или сычужный фермент), расщепляющая одну пептидную связь в  $\kappa$ -казеине. Традиционно этот фермент вырабатывается из слизистой оболочки желудка телят. В связи с труднодоступностью и дороговизной сырья в течение длительного времени шли поиски заменителя ренина. Однако ни одна из известных протеаз, в том числе микробного происхождения, не отвечала требованиям сыроделов. Только в последнее время удалось получить ренин методом генной инженерии, путем внедрения рекомбинантной ДНК, содержащей ген сычужного фермента телянка, в *E. coli*.

Более 25 % производимых ферментов являются *гликозидазами*, катализирующими расщепление различных поли- и олигосахаридов. Они применяются для гидролиза (осахаривания) крахмала, расщепления сахарозы и лактозы с целью получения моносахаридов и безлактозных продуктов, а также на разных стадиях производства пива. Для полного расщепления крахмала применяется пуллуланаза, катализирующая разрыв  $\alpha$ -1,6-гликозидных связей амилопектина в точках ветвления. Ферменты бактерий, способные катализировать гидролиз  $\beta$ -гликозидных связей в клетчатке, применяются в переработке сельскохозяйственной продукции, что увеличивает выход пищевых углеводов. Около четверти от общего количества вырабатываемых промышленностью ферментов, представлены энзимами разных классов, которые применяются в разных отраслях промышленности, в лечении и диагностике заболеваний, а также в генноинженерных исследованиях.

Производство глюкозооксидазы позволило создать простые автоматические анализаторы для определения глюкозы в крови, что имеет жизненно важное значение для больных сахарным диабетом. Другие окислительно-восстановительные ферменты (дегидрогеназы) также используются для аналитического определения различных веществ в биологических жидкостях и тканях.

В химическом синтезе используется свойственная энзимам стереохимическая специфичность, то есть способность «узнавать» и катализировать превращение только одного (*L* или *D*) оптического изомера из рацемической смеси веществ. С помощью рацемаз разделяют оптические изомеры углеводов, аминокислот и других органических веществ, что чрезвычайно трудно осуществить физико-химическими методами. Объем продаж ферментов на мировом рынке составляет сотни миллионов долларов в год, при этом их производство ежегодно возрастает на 10–15 %.

Ферменты получают из сырья растительного и животного происхождения, однако наиболее дешевым и технологичным источником ферментов являются микроорганизмы. В них найдено около половины из более 3000 открытых к настоящему времени ферментов, при этом на долю ферментных белков приходится до 5 % от общего количества содержащихся в микроорганизмах белковых веществ.

Основные этапы получения ферментов из микроорганизмов:

- культивирование продуцентов в питательной среде в течение 1–7 суток;
- выделение клеток путем центрифугирования и их отмывание;
- дезинтеграция (разрушение) клеток;
- центрифугирование цитозоля, выделение ферментов из надосадочной жидкости путем высаливания и гельфильтрации;
- очистка от низкомолекулярных примесей путем диализа, высушивание, контроль активности и фасовка.

### Контрольные вопросы:

- 1 С какими отраслями науки тесно связана биотехнология?
- 2 Осветите основные направления развития пищевой промышленности с использованием биотехнологий.
- 3 Опишите биотехнологические процессы, основанные на брожении.
- 4 Как происходит получение белка одноклеточных организмов?
- 5 Охарактеризуйте технологию получения ферментов.
- 6 Расскажите о применении достижений биотехнологии в медицине (ферменты, гормоны, катализаторы).
- 7 Как используется биомасса для получения энергии?
- 8 Какова роль биотехнологии в переработке отходов?

## ТЕМА 15. СОВРЕМЕННАЯ BIOTEХНОЛОГИЯ

### Генная инженерия

Для повышения производительности биотехнологического процесса необходим постоянный поиск и селекция более активных продуцентов (сверхпродуцентов) того или иного продукта жизнедеятельности. В традиционной биотехнологии для этого проводили отбор микро- или макроорганизмов, которые в результате случайных мутаций приобретали более высокую продуктивность. Например, систематический отбор (скрининг) грибов направлен на поиск видов и штаммов, способных синтезировать антибиотики, подавляющие рост бактерий. В сельском хозяйстве применяется внутривидовое скрещивание и гибридизация высокопродуктивных пород животных и сортов растений. Открытие механизмов мутаций позволило целенаправленно изменять передаваемые по наследству свойства с помощью химических мутагенов или путем ионизирующих излучений. Так, семена растений стали обрабатывать жестким излучением из кобальтовых пушек.

Однако, использование этих методов не всегда дает ожидаемый результат. При скрещивании разных пород гибрид получает гены не только с полезными, но и с ненужными, или даже вредными признаками. Кроме того, путем мутации невозможно изменить только один ген, который кодирует интересующий исследователя белок. Под действием химических или физических мутагенных факторов происходят нарушения структуры ДНК в разных участках, поэтому наряду с положительными можно получить и трудно прогнозируемые отрицательные результаты.

Совершенно новые возможности открывает перед биотехнологией создание рекомбинантных ДНК, т. е. молекул со встроенными участками (генами), взятыми из другого организма. Известно, что скрещивание или гибридизация возможны только внутри одного вида, тогда как методом генной инженерии можно получить молекулу бактериальной ДНК с встроенным в нее геном человека или животного. В настоящее время с помощью рекомбинантных ДНК производят интерфероны и интерлейкины (факторы иммунитета, применяющиеся при лечении многих заболеваний), гормон роста и другие вещества. Методы получения рекомбинантных ДНК легли в основу нового научно-производственного направления – генной инженерии.

Сущность генной инженерии состоит в целенаправленной перестройке генетического аппарата (генома) клеток для изменения их генетических характеристик. Эта задача осуществляется путем создания мо-

лекулярных химер ДНК, состоящих из фрагментов разного происхождения, например, из ДНК теленка, ДНК бактерии, или путем включения полученных искусственно ДНК, которых ранее не было в природе, в клетки-реципиенты, с целью синтеза ими определенного белка.

Технологии рекомбинантных ДНК наиболее успешно используются для направленной модификации микробиологических систем, используемых для получения «коммерческих» продуктов». Такие микробиологические системы производят белковые препараты, различные низкомолекулярные биорегуляторы и биополимеры.

В настоящее время созданы рекомбинантные микроорганизмы, способные синтезировать L-аскорбиновую кислоту (одно из первых исследований 1985 года), краситель индиго, аминокислоты, антибиотики, мономерные единицы различных биополимеров. Этот подход может превратить бактерии не только в «фабрики» по производству белков с заданными свойствами, но и низкомолекулярных веществ с необычными (не токсичными для данного микроорганизма-производителя) свойствами. Например, весьма востребован каучук, получаемый из особых растений. Его биосинтез начинается с превращения простых сахаров и включает 17 ферментативных реакций. В ходе последней из них происходит полимеризация аллилпирофосфатных остатков с образованием цис-1,4-полиизопрена.

Некоторые примеры использования рекомбинантных микроорганизмов и продуктов микробного синтеза представлены в таблице 12.

**Таблица 12 – Области применения рекомбинантных микроорганизмов**

<b>Область применения</b>	<b>Примеры</b>
Медицина и ветеринария	Производство инсулина, интерлейкинов, интерферона, гормона роста, эритропоэтина, ДНК-азы, иммуноглобулинов, рекомбинантных вакцин
Сельское хозяйство	Микробные инсектициды, микробные удобрения, производство стимуляторов роста растений
Биодеградация	Утилизация целлюлозы, ароматических соединений, производство этанола
Производство ферментов и малых биомолекул	L-аскорбиновая кислота, антибиотики, аминокислоты (лизин, триптофан и др.), эндонуклеазы рестрикции и другие ферменты для исследовательских нужд

Для получения рекомбинантных микроорганизмов, производящих каучук было проведено:

– с помощью мРНК из растения *Hevea brasiliensis*, синтезирующего каучук, была создана библиотека κДНК;

– произведена гибридизация ДНК-зондом, соответствующим по нуклеотидной последовательности гену полимеразы каучука;

– полученный клон кДНК (или несколько клонов, кодирующих несколько ферментов пути синтеза каучука) можно ввести в бактериальные клетки;

– продуктом экспрессии таких рекомбинантных клеток будет биополимер – каучук. Вариантом использования кДНК, кодирующей ферменты синтеза каучука, может быть ферментативная биосинтетическая технология *in vitro*.

Примерно 40 лет назад были открыты почвенные микроорганизмы, способные разрушать чужеродные вещества (ксенобиотики). Оказалось, что разные штаммы *Pseudomonas* способны расщеплять более 100 органических соединений. В 1981 году А. М. Чакрабартти получил патент на получение мультиплазмидных микроорганизмов, способных утилизировать несколько соединений. Он взял четыре разные бактерии, каждая из которых имела плазмиду (ДНК), кодирующие определенные ферменты деградации одного вещества, и создал микроорганизм («супербацилла»), содержащий плазмиды, которые обуславливали деградацию четырех веществ: камфары, октана, салицилата и нафталина. Объединяя плазмиды разных штаммов *Pseudomonas* в одном хозяине, можно создать организм, способный деградировать заданный комплекс загрязняющих веществ.

С помощью генетических манипуляций можно расширить спектр субстратов, разрушаемых с помощью определенного метаболического пути (модифицируя специфичность ферментов) и подобрать условия ферментативной деградации ксенобиотиков (например, обезвреживание в воде при температуре, близкой к точке замерзания и др.). Использование технологии рекомбинантных ДНК может сделать процесс обезвреживания токсических веществ во внешней среде более безопасным и дешевым по сравнению с существующими заводами по утилизации отходов.

### Генетически модифицированные источники пищи

Возможности генетической инженерии позволяют создавать генетически модифицированные источники пищи.

Растения, животные, микроорганизмы, полученные с помощью генноинженерной биотехнологии, называются генетически измененными, а продукты их переработки – *трансгенными пищевыми продуктами, или генетически модифицированными источниками (ГМИ)*.

Создание генетически модифицированных источников растительно-го происхождения, являющихся сырьем для производства пищевых про-

дуктов, связано с возможностью придать сельскохозяйственным растениям новые полезные свойства: повысить пищевую ценность, устойчивость растений к неблагоприятным погодным условиям, патогенам и вредителям и т. д. Техника рекомбинантных ДНК (генная инженерия) и ее применение к растениям способствует преодолению барьеров, препятствующих межвидовому скрещиванию. Она позволяет также увеличить генетическое разнообразие культивируемых растений.

Первый ГМИ – устойчивый при хранении томат марки «Flavr Savr» («Calgene Inc.», США) – появился на продовольственном рынке США в 1994 г. после 10 лет предварительных испытаний. В последующие годы ГМИ, разрешенных для использования в США, Канаде, Японии и странах Европейского союза, стало значительно больше: это кукуруза, картофель, соя, тыква, сахарная свекла, папайя. В 1999 г. в России была зарегистрирована первая генетически модифицированная соя линии 40–3–2 («Monsanto Co», США). На настоящий момент созданы и разрешены для использования в питании человека сотни ГМИ, число которых продолжает увеличиваться.

В результате трангенной модификации растения становятся устойчивыми к гербицидам, инсектицидам, вирусам, приобретают новые потребительские свойства. При этом уменьшается количество применяемых пестицидов, снижается их остаточное содержание в продукции, сокращается время технологических операций при переработке, уменьшаются потери, повышается качество продукции, экономятся средства и материальные ресурсы.

В США производится более 150 наименований ГМИ. Наиболее распространенной является соя, которая используется при производстве более 3000 пищевых продуктов: супов, детских каш, картофельных чипсов, маргаринов, салатных соусов, рыбных консервов и др. Из ГМИ-хлопка, рапса изготавливают хлопковое и рапсовое масла, из ГМИ-картофеля – картофель фри, из помидоров медленного созревания – кетчуп и др.

Трансгенные продукты, не имеющие отличий в составе и свойствах от традиционных продуктов-аналогов и не содержащие ДНК и белок, разрешено использовать без проведения исследований их безопасности как генетически модифицированных источников. Их относят к первому классу безопасности и считают безвредными для здоровья потребителей. К таким продуктам относятся: пищевые и ароматические добавки, рафинированные масла, модифицированные крахмалы, мальтодекстрин, сиропы глюкозы, декстрозы и др.

Важное значение приобретают новые технологии получения трансгенных сельскохозяйственных животных и птицы, направленные на по-

вышение продуктивности и оптимизацию отдельных частей и тканей животного, что оказывает положительное влияние на качество и физико-химические показатели мяса, его технологичность и промышленную пригодность, особенно в условиях дефицита отечественного мясного сырья.

Возможности генной инженерии позволяют менять структуру и цвет мышечной ткани, ее pH, жесткость, влагоудерживающую способность, степень и характер жирности (мраморность), а также консистенцию, вкусовые и ароматические свойства мяса после технологической переработки. Кроме того, с помощью генной инженерии можно повысить приспособляемость животных и птицы к вредным факторам окружающей среды, получить устойчивость к заболеваниям, направленно изменить наследственные признаки.

В области генной инженерии микроорганизмов большая часть исследований направлена на отбор продуцентов ферментов, витаминов, антибиотиков, органических кислот и других полезных веществ.

Известны полученные с помощью генетически измененных бактерий ферменты, которые применяют при выпечке хлеба (мука при этом осветляется, а хлеб становится более пышным). В Германии получены трансгенные пектиназы для производства соков, причем показано, что в готовых соках и винах эти пектиназы отсутствуют.

Во многих странах, например, странах Европейского союза, Австралии, Новой Зеландии и др., регистрация продуктов, полученных с помощью таких «нетрадиционных» ферментов, является обязательной.

### Трансгенные растения

*Трансгенные растения, не содержащие маркерные гены.* Обычно при введении чужеродного гена, кодирующего желаемый признак, в растение одновременно вводится и селективный маркерный ген. Продукты экспрессии маркерных генов служат для отбора клеток с желаемыми свойствами, например, по их чувствительности к антибиотикам. Выполнив свою вспомогательную роль по трансформации растительной клетки, селективные маркерные гены способны вызывать негативные эффекты:

- белки – продукты их экспрессии могут оказаться аллергенами или токсинами;
- гены устойчивости к антибиотикам могут попасть в патогенные почвенные микроорганизмы;

— один селективный маркерный ген не используется дважды, поэтому его присутствие может затруднить трансформацию трансгенных растений дополнительными генами.

В связи с этим были предложены методы удаления маркерных генов из трансгенных растений. Например, получение безмаркерных трансгенных растений включает котрансформацию растений двумя разными ДНК, одна из которых несет маркерный ген, а другая — вводимый ген желаемого признака. В этом случае 30–80% растений содержат оба гена, которые введены в разные участки хромосомной ДНК. После отбора трансформированных растений с помощью продуктов экспрессии маркерного гена, его удаляют из трансгенного растения путем обычного скрещивания.

*Устойчивость к насекомым-вредителям.* В конце прошлого века в мире было израсходовано более 4 млрд долларов на использование химических инсектицидов. Их многократное применение (опрыскивание) в течение вегетационного периода требует технических устройств и отвлечения людей. Поэтому целесообразно создание растений (например, злаковых), способных продуцировать функциональные инсектициды. Для создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям, с помощью генноинженерных методов были разработаны различные технологии.

Один из популярных подходов базируется на использовании гена инсектицидного протоксина, продуцируемого *Bacillus thuringiensis* (микробный инсектицид). Инсектицид (токсин белковой природы) находится в клетке в виде так называемого параспоровального кристалла — структуры, которая образуется во время споруляции бактерий. На его долю приходится 20–30 % сухой массы спорулирующей культуры (95 % — белок, 5 % — углеводы). Кристалл — это четвертичная структура белка, диссоциирующая на субъединицы при щелочном значении pH.

Выделяют 4 основных класса токсина: CryI — токсичен для чешуекрылых, CryII — для чешуекрылых и двукрылых, CryIII — для жесткокрылых, CryIV — для двукрылых, которые разделяются на подклассы и подгруппы. В параспоровальном кристалле инсектицид неактивен; при солюбилизации кристалла белок высвобождается в форме протоксина, предшественника активного токсина. Молекулярная масса протоксина CryI около 130 кДа.

После заглатывания насекомым параспоровального кристалла протоксин активируется в кишечнике в условиях щелочного pH (7,5–8,0) и под действием пищеварительных протеиназ превращается в активный токсин с молекулярной массой 68 кДа. Этот токсин встраивается в мембрану эпителиальных клеток кишечника и образует канал, через который

утрачивается часть АТФ и других компонентов клетки. Насекомое перестает питаться, обезвоживается и погибает.

Для создания трансгенных растений, которым введен ген токсина *Bacillus thuringiensis* было использовано несколько приемов.

1. Был введен ген N-концевой части молекулы токсина (отвечает за токсичность) и вместе с сильным растительным промотором (для повышения экспрессии гена); количество синтезированного растением токсина увеличилось, и была достигнута некоторая защита от насекомых (трансгенный томат). Эффективность такого подхода была недостаточной из-за того, что в переносимом гене присутствовали нуклеотидные последовательности, характерные для бактерий и замедляющие экспрессию гена в растительных клетках.

2. С помощью сайт-специфического мутагенеза, а также химического мутагенеза были получены измененные гены токсина, клонирование которых в растительных клетках увеличило продукцию токсина в 100 раз. В США проведены успешные испытания и дано разрешение на использование инсектицидного токсина *Bacillus thuringiensis* для повышения устойчивости картофеля к колорадскому жуку. Следует помнить, однако, о необходимости постоянного контроля популяции насекомых-вредителей, с тем, чтобы вовремя обнаружить устойчивые организмы. В настоящее время ведутся работы по введению бактериального гена холестеролоксидазы в хлопчатник для борьбы с личинками хлопкового долгоносика (фермент разрушает эпителиальные клетки средней кишки насекомого).

3. Были проведены эксперименты, которые показали возможность индукции синтеза протоксина путем обработки трансгенного растения недорогим и безопасным химическим веществом (например, салициловой или полиакриловой кислотой) в определенный момент вегетационного периода. Такая периодичность синтеза позволяет замедлить развитие устойчивости у насекомых к микробному инсектициду, продуцируемому растением. Аналогичные системы могут оказаться полезными для регуляции синтеза самых разных чужеродных белков в трансгенных растениях.

Другой подход базируется на том, что некоторые растения синтезируют ингибиторы протеиназ, которые, попадая в кишечник насекомого, блокируют гидролиз растительных белков. Возникло предположение о введении растительного гена ингибитора протеиназ с сильным растительным промотором в растительные клетки. Например, был клонирован ген, кодирующий ингибитор трипсина вигны китайской, в табак. Оказалось, что ущерб, наносимый личинками совки (*Heliothis virescens*) трансгенным растениям, синтезирующим более 2 мкг ингибитора трипсина на

1 мг растительного белка, был значительно меньше, чем в случае обычных растений. Введение гена ингибитора II протеиназы картофеля в растения риса защищает их от розового стеблевого точильщика (*Sesamia inferens*), основного насекомого-вредителя для этой культуры; заражение приводит к образованию полых стеблей и мертвых метелок без семян. Поскольку растительные ингибиторы протеиназ являются обычными компонентами рациона человека и животных и в процессе приготовления пищи быстро инактивируются, их введение в новые зерновые культуры можно считать безопасным.

Третий подход сформировался на основе двух предыдущих: использование токсина *Bacillus thuringiensis* и ингибитора протеиназ сериновой природы. Оказалось, что смесь очищенного токсина *Bacillus thuringiensis* в количестве, обеспечивающем минимальную смертность насекомых, и ингибитора протеиназ в низких концентрациях обладает в 20 раз большей инсектицидной активностью, чем один протоксин *Bacillus thuringiensis*. Четвертый подход предполагает введение в растительные клетки гена, кодирующего ингибитор альфа-амилазы. Большой ущерб зерновым наносят зерновка (*Callosobruchus maculatus*) и долгоносик лучистой фасоли (*C. Chinensis*). Если питать этих насекомых обычной фасолью (*Phaseolus vulgaris*), то они погибают из-за присутствия в ней ингибитора альфа-амилазы, а следовательно подавления гидролиза крахмала – основного продукта питания насекомых. Был выделен ген этого ингибитора и клонирован в растение, весьма чувствительное к насекомым, горох (*Pisum sativum*). В результате были получены растения трансгенного гороха, устойчивые к обоим насекомым.

**Устойчивость к вирусам.** Вирусы растений существенно снижают урожай. Чтобы не прибегать к обработке культур химическими препаратами, селекционеры попытались перенести природные гены устойчивости к вирусам от одной линии растений к другой. Однако устойчивость растений быстро утрачивалась.

Природный иммунитет к вирусным инфекциям обуславливается разными причинами:

- блокированием проникновения вируса в растение;
- предотвращение распространения вируса в здоровые клетки;
- подавление симптомов вирусной инфекции.

Чтобы получить растения, устойчивые к вирусам, проводили их «иммунизацию» вирусными генами, кодирующими белки оболочки, другими вирусными генами или антисмысловыми последовательностями вирусного генома. Обнадеживающие результаты были получены, если в трансгенном растении экспрессируется ген, кодирующий белок оболочки вируса: создано множество трансгенных зерновых и других

растений. Механизм подавления пролиферации вирусных частиц в присутствии произведенного растением белка оболочки вируса пока неясен. Ценность подхода увеличивается в связи с тем, что ген белка оболочки одного вируса иногда обеспечивает устойчивость к широкому кругу неродственных вирусов.

Защита растений от патогенных вирусов может осуществляться естественными противовирусными белками, синтезируемыми самими растениями. Например, в клеточной стенке фитолакки американской (*Phytolacca americana*) присутствуют три разных противовирусных белка: РАР, синтезируемый в листьях весной, РАРII, обнаруживаемый в листьях летом, и РАР-S, содержащийся в семенах. Эти белки легко выделить из водных экстрактов измельченных тканей растения. Если небольшое количество РАР нанести на листья других растений, то последние также окажутся устойчивыми к нескольким вирусам. Ген РАР был использован для получения трансгенных растений, устойчивых к широкому спектру вирусов растений.

*Устойчивость к гербицидам.* Известно, что почти 10 % урожая теряется из-за сорняков. Для борьбы с сорняками используется около 100 химических гербицидов, на производство которых в мире тратится 10 млрд долларов США. В присутствии гербицидов сельскохозяйственные растения не должны терять продуктивность.

Для этого их необходимо генетически трансформировать, чтобы:

- уменьшить поглощение гербицида культурным растением;
- уменьшить способность белка, чувствительного к гербициду, к связыванию с ним;
- обеспечить синтез белка, чувствительного к гербициду в таком количестве, чтобы его хватало на выполнение присущих ему функций в присутствии гербицида;
- обеспечить инактивацию гербицида в ходе метаболизма культурного растения.

Были получены растения, устойчивые к глифосфату – гербициду, быстро разлагающемуся в почве на нетоксические составляющие и потому безопасному для окружающей среды. Глифосфат является ингибитором 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS) – фермента, играющего важную роль в синтезе ароматических аминокислот и у бактерий, и у растений. Из глифосфатустойчивого штамма *E.coli* был выделен ген, кодирующий EPSPS, помещен под контроль растительного промотора и введен в растительные клетки. Трансгенные растения табака, петунии, томата, картофеля и хлопка, синтезировавшие EPSPS в количестве, достаточном для замены ингибированного гербицидом растительного

тельного фермента, были устойчивы к глифосфату и при обработке, в отличие от сорняков, не погибали.

*Устойчивость к грибам и бактериям.* Фитопатогенные грибы наносят ощутимый ущерб сельскохозяйственной продукции. Например, в странах, где выращивается рис, ущерб от гриба, вызывающего пирикулярриоз риса, оценивается в 5 млрд долларов. Выведены растения, устойчивые к болезнетворным грибам, за счет переноса и экспрессии генов PR-белков (pathogenesis-related proteins) –  $\beta$ -1,3-глюканаза, хитиназа, тауматинподобные белки, ингибиторы протеиназ. Все эти белки подавляют жизнедеятельность патогенных грибов.

Ущерб, наносимый урожаю картофеля почвенной бактерией *Erwinia carotovora*, составляет до 100 млн долларов в год. Химических способов защиты от этого патогена не существует. Поэтому было создано трансгенное растение картофеля, способное экспрессировать ген лизоцима бактериофага T4. Лизоцим секретируется в апопласт (межклеточное пространство, т. е. в компартмент куда проникают болезнетворные бактерии и лизировал их. Поскольку лизоцим лизирует различные грамположительные и грамотрицательные растения, этот подход перспективен для защиты растений от других патогенных бактерий.

*Устойчивость к неблагоприятным воздействиям и старению.* Растение не способно активно избегать неблагоприятных факторов внешней среды: высокой освещенности, ультрафиолетового облучения, высоких температур, концентраций солей и др. Для защиты срабатывают эволюционно отобранные механизмы «физиологического стресса». В составе этих реакций присутствуют свободнорадикальные, вызывающие образование радикальных форм кислорода – «окислительный стресс» – супероксидный, гидроксидный, пероксидный радикалы. Для обезвреживания супероксидного радикала служит фермент супероксиддисмутаза. Известно, что Cu/Zn-супероксиддисмутаза содержится в хлоропластах, Mn-супероксиддисмутаза – в митохондриях; некоторые растения синтезируют Fe-супероксиддисмутазу. Созданы трансгенные растения устойчивые к очень яркому свету путем переноса и экспрессии гена Cu/Zn-супероксиддисмутаза: у контрольных растений фотосинтетическая активность утрачивалась, а у трансгенных сохранялась на уровне 94 %. Растения, произрастающие на засоленных почвах, синтезируют нетоксичные вещества – осмопротекторы. Они способствуют поглощению и удержанию воды, а также предотвращают разрушение макромолекул, присутствующих в клетках растений, под действием высоких концентраций солей. Осмопротекторами являются сахара, спирты, пролин и четвертичные соединения аммиака. Одним из высокоактивных осмолитиков является бетаин, который накапливается в некоторых растениях

во время засухи или при высокой засоленности почв. Были созданы устойчивые растения путем переноса гена кишечной палочки, кодирующий синтез ферментов бетаинообразования.

*Контроль времени созревания плодов.* Преждевременное созревание и размягчение плодов затрудняет их транспортировку. Известно, что при созревании плодов в растениях активируются специфические гены, кодирующие ферменты целлюлазу и полигалактуроназу. Если подавить их экспрессию, созревание будет замедляться.

Созданы трансгенные растения томата, в которых нарушен синтез полигалактуроназы, плоды которых удобны для транспортировки и с 1994 года разрешены к реализации Департаментом по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США как безопасные. Другим фактором, ускоряющим созревание плодов, является этилен. Он синтезируется из S-аденозилметионина с образованием промежуточного продукта 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АСС). Созданы трансгенные растения томата, в которых подавлен синтез ААС, а, следовательно, и этилена. Из некоторых почвенных растений был выделен ген ААС-дезаминазы и введен в геном томата. Полученные растения синтезировали меньше этилена, чем нормальные, а их плоды тоже имели гораздо более длительный срок хранения.

*Изменение декоративных свойств растений.* Примерно 70 % объема индустрии цветоводства приходится на долю четырех растений: роз, гвоздик, тюльпанов и хризантем. В окраске цветов важную роль играют флавоноиды – антоцианины. Они синтезируются из фенилаланина. Окраска цветка определяется химическими свойствами флавоноидов, например, цианидина (красный цвет) и дельфинидина (синий цвет). Созданы трансгенные цветковые растения, у которых подавлена или введена новая ферментативная реакция в метаболических цепях превращений антоцианинов, что обеспечило новые коммерчески выгодные варианты формы и окраски цветов. Трансгенные растения, синтезирующие Мп-супероксиддисмутазу, в 3–4 раза менее чувствительны к действию озона. В перспективе – создание трансгенных цветковых растений, содержащих супероксиддисмутазу, препятствующую увяданию.

*Изменение пищевой ценности растений* реализуется методами генетической инженерии по следующим направлениям:

- изменение аминокислотного состава запасных белков семян;
- изменение жирнокислотного состава плодов;
- улучшение вкуса фруктов путем введения в растения гена монеллина (растительного белка, имеющего сладкий вкус).

Известно, что запасные белки, которые служат источниками углерода и азота прорастающих семян, состоят из ограниченного повторяющегося набора аминокислот, среди которых отсутствуют некоторые незаменимые аминокислоты. Для повышения биологической ценности запасных белков, например, путем обогащения лизином, был апробирован метод отмены ингибирующего действия лизином своего собственного синтеза. Для этого в растительные клетки были введены регуляторные гены биосинтеза лизина микробного происхождения, которые отличались от растительных тем, что они не чувствительны к ингибирующему действию лизина. В семенах полученных трансгенных растений содержалось в 100 раз больше свободного лизина.

Считают, что спустя 5–7 лет в мире будет выработано растительного масла на сумму 70 млрд долларов. Около 75 % всех масличных культур приходится на долю сои, пальмы, рапса (канолы) и подсолнечника. В получаемых маслах содержатся пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая и линоленовая жирные кислоты.

С помощью генетической инженерии созданы десятки сортов рапса, которые синтезировали масла с измененным жирнокислотным составом. Каждый трансгенный сорт содержал один дополнительный ген, который кодировал белки-ферменты, обеспечивающие накопление одной жирной кислоты.

*Изменения внешнего вида и вкуса.* Изменение цвета овощей и фруктов начинается с окисления монофенолов и о-дифенолов до охинонов. Этот процесс катализируют полифенолоксидазы, локализующиеся в мембранах хлоропластов и митохондрий. Начаты исследования по созданию трансгенных растений, окраску которых можно будет контролировать через введение и экспрессию генов полифенолоксидазы.

В плоде африканского растения *Dioscorephyllum cumminsii* Diels содержится белок монеллин, примерно в 100000 раз более сладкий, чем сахароза в эквивалентных количествах. Ген монеллина был химически синтезирован и введен в растительные клетки инфицированием их *A. tumefaciens*, используя Ti-плазмиды. Монеллин был обнаружен в зрелых помидорах и листьях салата.

*Растения как биореакторы.* В настоящее время имеются экспериментальные установки по получению с помощью растений моноклональных антител, функциональных фрагментов антител и подверженного биодegradации биополимера поли-β-гидроксипропириата.

Рассмотрим этапы создания трансгенного растения, производящего данный биополимер.

1. В бактериях *Alcaligenes eutrophus* поли-β-гидроксibuтират синтезируется из ацетил-КоА с тремя ферментами, гены которых входят в один оперон. Растения могут экспрессировать только один ген.

2. Каждый из генов был клонирован по отдельности и встроен в хлоропластную ДНК растения *Arabidopsis thaliana*.

3. Два трансгенных растения, каждое со своим чужеродным геном, скрещивали, чтобы получить растения с двумя чужеродными генами, включенными в хлоропластную ДНК.

4. Полученное трансгенное растение с двумя чужеродными генами скрещивали с растением, несущим третий чужеродный ген, и отбирали растения, несущие все три бактериальных гена поли-β-гидроксibuтирата. В листьях такого трансгенного растения, экспрессирующего все три бактериальных гена, синтезировалось более 1 мг поли-β-гидроксibuтирата на 1 г сырой ткани листа.

### Трансгенные животные

Стратегия скрещивания и отбора, хотя и требует много времени, остается основой выведения новых пород сельскохозяйственных животных, птицы и рыб. Однако после выведения эффективной генетической линии добавление новых признаков без риска утраты создаваемых свойств потребовало новых методических и биотехнологических подходов, в частности, путем переноса ядра из эмбриональной клетки в яйцеклетку с удаленным ядром (перенос ядра, клонирование):

- клонированный ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки;
- инокулированные оплодотворенные яйцеклетки имплантируют в матку самки;
- отбирают потомков, развившихся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках;
- скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

*Трансгенные животные: методология*

Ведение чужеродной ДНК животным осуществляют несколькими способами:

1. С помощью ретровирусных векторов, инфицирующих клетки эмбриона на ранних стадиях развития перед имплантацией эмбриона в самку-реципиента. Эмбрион, обычно находящийся на стадии 8 клеток, инфицируют рекомбинантным ретровирусом, несущим трансген. Самки, которым был имплантирован эмбрион («суррогатные» матери), производят на свет трансгенное потомство.

2. Микроинъекцией в увеличенное ядро спермия (мужской пронуклеус) оплодотворенной яйцеклетки. У млекопитающих после проникновения сперматозоида в яйцеклетку ядро спермия (мужской пронуклеус) и ядро яйцеклетки существуют раздельно. Мужской пронуклеус обычно гораздо больше женского, его легко локализовать с помощью секционного микроскопа и ввести в него чужеродную ДНК. Это лежит в основе метода получения линий трансгенных животных методом микроинъекций:

- яйцеклетки выделяют из самок-доноров, у которых была индуцирована гиперовуляция и проведено спаривание с самцами. Гиперовуляция вызывается введением самкам сыворотки беременной кобылы и хорионического гонадотропина человека (увеличивается образование яйцеклеток в 3–7 раз);

- трансгенную конструкцию инъецируют в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки;

- яйцеклетки имплантируют в «суррогатную» мать, которая производит на свет трансгенное потомство;

3. Введением генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток в предимплантированный эмбрион на ранних стадиях развития. Этот метод получил развитие в экспериментах на мышах. Клетки, выделенные из мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя способность к дифференцировке в любые типы клеток. Такие клетки называются плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками (ES). ES-клетки в культуре легко модифицировать методами генетической инженерии без нарушения их плюрипотентности.

- ES-клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши;

- их трансформируют вектором, несущим трансген, культивируют и идентифицируют трансформированные клетки методом позитивно-негативной селекции или ПЦР;

- популяцию трансформированных клеток вновь культивируют и вводят в бластоцисты, которые затем имплантируют в матку «суррогатных» матерей;

- скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных мышей.

4. Клонированием с помощью переноса ядра. Опыты были поставлены на овцах (у этих животных в течение первых трех делений зиготы, занимающих несколько суток, происходит только репликация ДНК и ни один из генов не экспрессируется).

Клонирование овечки Долли из ядра дифференцированной клетки осуществляли следующим образом:

- ядро яйцеклетки удаляли с помощью микропипетки;
- культивировали эпителиальные клетки молочной железы (дифференцированные клетки) взрослой особи и переводили их в фазу клеточного цикла G0;
- осуществляли слияние эпителиальных клеток в G0-фазе и яйцеклеток, лишенных ядра. Получали яйцеклетки с ядрами от эпителиальных клеток. – Выращивали восстановленные яйцеклетки в культуре или в яйцеводе с наложенной лигатурой до ранних стадий эмбриогенеза;
- имплантировали яйцеклетки с ядрами эпителиальных клеток молочной железы в матку «суррогатной» матери, где и происходило развитие плода. Все перечисленные обладают крайне низкой эффективностью и не могут пока найти широкое применение в практике. Так, например, при получении клонированной овечки было проведено слияние 277 яйцеклеток с удаленными ядрами с клетками молочной железы в фазе G0; из 29 эмбрионов только один развился до жизнеспособного плода.

5. Для трансгеноза используют также искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), несущие множество генов. Напомним, что дрожжи – это эукариотические клетки, в которых возможна посттрансляционная модификация белков.

Таким образом, были получены мыши, синтезирующие только человеческие антитела. Их использовали в качестве модельных систем для изучения генетических болезней человека (например, болезни Альцгеймера).

#### *Трансгенные сельскохозяйственные животные.*

Трансгеноз крупного рогатого скота может преследовать следующие цели:

- изменение содержания в молоке различных его компонентов, например, увеличение доли капа-казеина позволит увеличить получение сыра;
- введение гена лактазы позволит получить молоко, в котором разрушена лактоза. Такое молоко могут употреблять в пищу люди с дефектом лактазы пищеварительного тракта (непереносимость молока);
- выведение животных, устойчивых к вирусным и бактериальным инфекциям, а также к паразитарным инвазиям. Разрабатываются методы введения генов, ответственных за продукцию белков неспецифической и иммунной резистентности;
- использование молочной железы коров как биореактора.

Предположим, что корова дает в год 10000 л молока, содержащего 35 г белка в 1 л. Если в молоке будет содержаться такое количество ре-

комбинантного белка и эффективность его очистки составит 50 %, то от 20 трансгенных коров можно будет получать примерно 100 кг такого белка в год. Примерно столько белка С требуется ежегодно, например, для предотвращения тромбообразования в сосудистом русле больных людей.

Трансгенные овцы и козы создавались для биосинтеза и секреции в молоко белков человека: активатор плазминогена, антитрипсин, фактор IX системы свертывания крови, лактоферрина, урокиназы, интерлейкина-2 и др. В отличие от трансгенных бактерий-прокариот, в молочных железах-биореакторах достигалась посттрансляционная модификация человеческого белка, в частности – гликозилирование. Были созданы трансгенные овцы с повышенной скоростью роста шерсти. Удалось создать трансгенных свиней, способных синтезировать человеческий гемоглобин.

Большой интерес представляет ксенотрансплантация клеток и тканей животных человеку. Например, трансплантация гормонпродуцирующих клеток инсулярного аппарата поджелудочной железы больным диабетом. Основная проблема таких операций заключается в остром отторжении ксенотрансплантата за счет активации комплемента. Были созданы трансгенные свиньи, пересаживаемые клетки которых содержали гены ингибиторов комплементов. Благодаря их экспрессии синтезировались белки, предотвращающие острую реакцию отторжения пересаженных человеку клеток свиньи.

*Трансгенные птицы и рыбы.* Получение трансгенных птиц оказалось достаточно сложной проблемой. В настоящее время трансгенные цыплята воспроизводятся трансфекцией изолированных клеток бластодермы. Выделенные клетки трансфицируют трансгеном с помощью липосом и вводят в подзародышевую область облученной бластодермы реципиента. Часть полученных потомков являются химерами, а некоторые из них, несущие трансген в клетках зародышевой линии, при скрещивании могут дать начало трансгенным линиям.

Трансгенных цыплят можно использовать для улучшения генотипа уже существующих пород – для придания им устойчивости к вирусным инфекциям и заболеваниям, вызываемым кокцидиями, повышения эффективности усвоения пищи, снижения уровня жира и холестерина в яйцах, повышения качества мяса. Было предложено также использовать яйцо с его высоким содержанием белка в качестве источника белковых продуктов, использующихся в фармацевтической промышленности. Экспрессия трансгена в клетках репродуктивного пути курицы, где обычно секретируется большое количество овальбумина, может способствовать накоплению соответствующего белкового продукта в яйце, от-

куда его можно затем выделить. По мере истощения природных рыбных запасов все большую роль будет приобретать разведение рекомбинантной рыбы в искусственных условиях путем трансгеноза.

### Клеточная инженерия

Клеточная инженерия – одно из наиболее важных направлений в современной биотехнологии, объектами которой являются микробы (бактерии, вирусы, протозойные организмы), а также клетки (ткани) растений, животных и человека.

Клеточная инженерия – занимается созданием клетки нового типа на основе их гибридизации, реконструкции и культивирования. В случае эукариотических организмов и в зависимости от объекта генетических манипуляций процесс может подразделяться на хромосомную (перенос больших групп генов или хромосом) и геномную (полный перенос генома) инженерию.

Базовым методом клеточной инженерии служит слияние (гибридизация) клеток микроорганизмов или соматических клеток животных и растений. Слияние клеток может быть проведено с использованием факторов слияния различного происхождения: физического (переменное электрическое или магнитное поле), химического (катионы, полиэтиленгликоль и др.), биологического (вирусы).

Клеточная инженерия расширяет возможности получения новых ценных штаммов микроорганизмов, сортов культурных растений и пород сельскохозяйственных животных, для создания которых ранее использовались методы классической селекции, требующие десятилетий.

За последнее время создан ряд межвидовых и межродовых гибридов табака, картофеля, томата и других растений. Использование достижений клеточной инженерии позволило разработать технологии получения безвирусных растений (например, картофеля) путем регенерации целого растения из одной соматической клетки.

В настоящее время культуры клеток широко применяются для производства противовирусных вакцин. Они дополняют, а возможно, когда-нибудь и заменят использование животных для тестирования безопасности и эффективности вакцин и лекарственных препаратов. Клетки насекомых, так же как растительные клетки и клетки животных, могут быть использованы для производства живых рекомбинантных противовирусных вакцин, сконструированных, например, на основе бакуловирусов. Их применение позволяет решить проблему безопасности, возникающую при получении и применении живых вакцин традиционным методом на основе аттенуированных штаммов. Кроме того, с их помощью

можно синтезировать лекарственные вещества, особенно некоторые белки животных, слишком сложные для того, чтобы синтезировать их с помощью генетически модифицированных микроорганизмов.

В основе метода лежит слияние клеток, в результате чего образуются гетерокарионы, содержащие ядра обоих родительских типов. Образовавшиеся гетерокарионы дают начало двум одноядерным гибридным клеткам. Впервые были получены гетерокарионы клеток мыши и человека. Такую искусственную гибридизацию можно осуществлять между соматическими клетками, принадлежащими далеким в систематическом отношении организмам, и даже между растительными и животными клетками. Гибридизация соматических клеток животных сыграла важную роль в исследовании механизмов реактивации генома покоящейся клетки и степени фенотипического проявления отдельных генов, клеточного деления, в картировании генов в хромосомах человека и в анализе причин злокачественного перерождения клеток. Первый межвидовой гибрид был получен в 1972 г. П. Карлсоном при слиянии протопластов из клеток разных видов табака.

Гибриды, полученные при слиянии протопластов, имеют важные отличия от половых гибридов, поскольку несут цитоплазму обоих родителей. Возможно создание гибридов, наследующих ядерные гены одного из родителей наряду с цитоплазматическими генами обоих родителей. Особый интерес представляют гибриды растений, несущие цитоплазматические гены мужской стерильности, устойчивости к различным патогенам и стрессорным факторам, полученным от дикорастущих видов.

Слияние протопластов используют также для получения гибридов с ценными в хозяйственном отношении свойствами между отдаленными видами, которые плохо или вообще не скрещиваются обычным путем. Удалось, например, получить соматический гибрид картофеля с томатами и т.д. При слиянии протопластов создают и новые клеточные линии-продуценты нужных веществ, используемых в различных отраслях народного хозяйства и в первую очередь в здравоохранении.

Одним из способов модификации клеток является введение в них индивидуальных генов. Встраивание активного гена на место отсутствующего или поврежденного открывает путь для лечения генетических заболеваний человека. Реконструкцию клеток проводят также при слиянии клеточных фрагментов друг с другом или с интактными клетками. В результате получают клетки с различными свойствами, например, гибриды либо клетки с ядром и цитоплазмой от разных родителей. Такие конструкции используют для изучения влияния цитоплазмы в регуляции активности ядра.

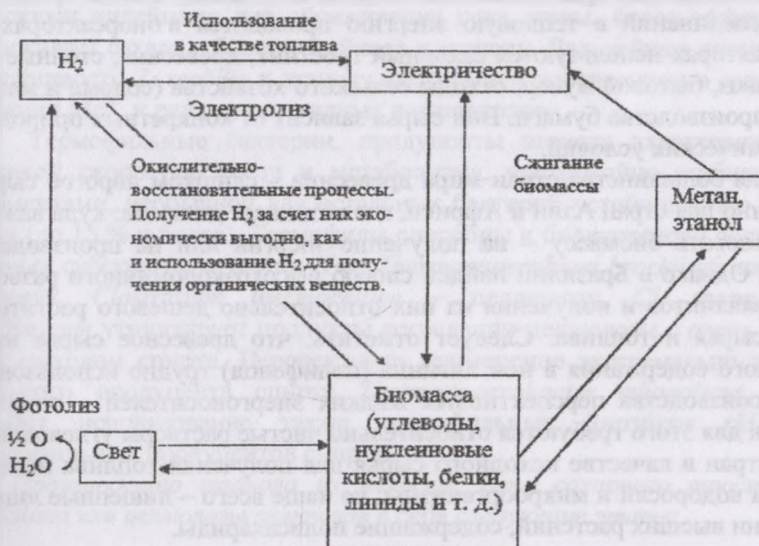
Отдельным направлением клеточной инженерии, имеющим огромное практическое значение, является получение гибридов, т. е. клеток, возникающих при слиянии родительских клеток из одного организма, но с разными программами дифференциации и развития. Это могут быть клетки из разных типов ткани или опухолевые клетки.

### Биотехнологическое производство энергии

Одна из перспективных отраслей современной биотехнологии – биоэнергетика, производство энергии из биотоплива различных видов с использованием объектов биотехнологии.

Учитывая все снижающееся количество традиционных энергоносителей (уголь, нефть, газ), запасы которых на земле не безграничны, а также низкий коэффициент эффективности сжигания топлива, при котором большая часть энергии теряется, проблема поиска новых способов получения энергии является ключевой для выживания земной цивилизации.

Для этой цели используется обычная биотехнологическая схема, но с необычным конечным продуктом, который представляет собой трансформированный энергетический эквивалент, аккумулирующий большую часть энергии химических связей использованных органических соединений. Пути трансформации энергии в живых системах, используемые в биотехнологии, можно изобразить следующим образом:



Первым этапом биотехнологического получения энергии является накопление биомассы за счет солнечного света. Ежегодно на Землю поступает  $3 \cdot 10^{24}$  Дж солнечной энергии, в то время как суммарный энергетический эквивалент всех запасов угля, нефти, газа и урана в земной коре составляет менее 1 % этого количества. Считается, что для удовлетворения всей мировой потребности в энергии 0,1 % поверхности земли должны занимать коллекторы солнечного света с коэффициентом полезного действия 10 %. Среди множества проблем реализации этого способа обеспечения энергией наиболее существенными являются неравномерность и диффузность солнечной инсоляции. Но эти ограничения перекрываются возможностями получения возобновляемого сырья, в котором аккумулирована солнечная энергия в виде химических связей органических соединений. Это сырье можно складировать и транспортировать. Главная трудность и до сих пор до конца не решенная технологическая задача – это эффективное извлечение энергии, содержащейся в биологическом сырье.

До настоящего времени 60 % древесины используется в качестве топлива. При этом эффективность использования биомассы в качестве топлива чрезвычайно мала (1–2 %) вследствие большого содержания воды и высокой температуры сжигания, что приводит к большим теплопотерям. Биологические процессы протекают при низких температурах (25–65°C) и для них пригодно сырье с высокой влажностью.

Экономичное преобразование энергии химических связей органических соединений в тепловую энергию проводится в биореакторах. В биореакторах используются сахарный тростник, древесина, сточные воды, навоз, бытовой мусор, отходы сельского хозяйства (солома и меласса) и производства бумаги. Вид сырья зависит от конкретных природно-экономических условий.

Для большинства стран мира древесина – слишком дорогое сырье, особенно для стран Азии и Африки, где возникает дилемма: куда важнее использовать биомассу – на получение энергии или на производство пищи. Однако в Бразилии найден способ высокоэкономичного разведения эвкалиптов и получения из них относительно дешевого растительного сырья и топлива. Следует отметить, что древесное сырье из-за большого содержания в нем лигнина (полифенол) трудно использовать для производства перспективных жидких энергоносителей – спиртов, так как для этого требуются относительно чистые растворы углеводов. В ряде стран в качестве исходного сырья для получения топлива используются водоросли и микроорганизмы, но чаще всего – лишенные лигнина ткани высших растений, содержащие полисахариды.

### Получение биоэтанола

Этанол – экологически чистое топливо, дающее при сгорании  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Он используется в двигателях внутреннего сгорания в чистом виде или как 10–20 %-ная добавка к бензину (газохол). В Бразилии уже к 1983 г. 75 % автомобилей работали на 95 %-ном этаноле, а остальные – на газохоле. В США предполагают заменить на этанол 10 % потребляемого бензина. Широкое внедрение этанола планируется в странах Западной Европы.

Очищенный этанол на мировом рынке стоит почти вдвое дороже метанола, но этанол отличается очень высокой эффективностью биоконверсии. Из 1 кг этанола можно получить до 880 г дрожжевой массы, а из 1 кг метанола – до 440 г. Биомасса из этанола особенно богата лизином – до 7 %.

На значительных посевных площадях намечают выращивать сельскохозяйственные культуры, предназначенные для биотехнологической переработки в этанол. В условиях дефицита посевных площадей возникает проблема, которая уже в наши дни актуальна для Бразилии и выражается дилеммой: продовольствие или энергия. Производство этанола из растительного сырья не является безотходным: на каждый литр спирта приходится 12–14 л сточных вод с высокой концентрацией отходов, опасных для природных экосистем. Проблема рациональной переработки этих отходов не решена.

Бактерия *Zymomonas mobilis*, применявшаяся центральными индейцами для сбраживания сока агавы, более эффективно сбраживает сахара и более устойчива к этанолу. Дальнейшее повышение устойчивости *Z. mobilis* к этанолу достигается добавлением в среду инакубации  $\text{Mg}^{2+}$  и ряда нуклеотидных компонентов.

Термофильные бактерии, продуценты этанола характеризуются высокой скоростью роста и метаболизма, чрезвычайно стабильными ферментами, необычной для остальных бактерий устойчивостью к этанолу (до 15 % и более). Термофилы способны к биоконверсии полисахаридных субстратов в этанол. Так, *Thermoanaerobium brockii* сбраживает крахмал, *Clostridium thermocellum* – целлюлозу, *Cl. thermohydrosulfuricum* утилизирует продукты деградации целлюлозы с очень высоким выходом спирта. Перспективно применение экстремально термофильного продуцента спирта *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Планируют использование также ацидофильных (оптимум pH 1,5) и галофильных продуцентов спирта.

Производство этанола из мелассы, сока сахарного тростника, крахмала или целлюлозы включает в себя следующие этапы:

- подготовка сырья: гидролиз, осветление, фильтрация, пастеризация;
- дрожжевая ферментация;
- перегонка для получения 96%-го спирта;
- обезвоживание для получения абсолютного спирта;
- денатурация;
- концентрирование кубовых остатков для получения удобрения, кормов, топлива, метана.

Для ферментации применяют дрожжи, обычно *Saccharomyces cerevisie*, которые могут расти на глюкозе, фруктозе, мальтозе и мальтотриозе, образующихся при гидролизе сахара и крахмалсодержащего сырья. Образование этанола дрожжами – анаэробный процесс. Но, для размножения дрожжей и поддержания их жизнедеятельности нужны следовые количества кислорода. Рост, деление дрожжевых клеток и образование спирта зависят от концентрации субстрата, которым служит соответствующий сахар, кислорода и конечного продукта (спирта).

Для увеличения выхода спирта отбирают штаммы дрожжей, наиболее устойчивых к повышенным концентрациям сахаров и спирта. После сбраживания концентрация спирта составляет 6–12 %. Концентрирование спирта осуществляется путем перегонки паром и осушением десятикратным по отношению к воде количеством бензола. Затем спирт денатурируют. Для этого добавляют горькие вещества или бензин. Процесс получения этилового спирта таким способом является дорогим и, как правило, характеризуется отрицательным энергобалансом.

Таким образом, количество энергии, расходуемое на производство этанола из крахмала или сахарной свеклы, превышает ее количество, запасенное в данном объеме спирта. Единственный пример положительного энергетического баланса получения спирта – это использование в качестве топлива отжатого сахарного тростника (багассы). Путями удешевления продукции является повторное использование дрожжей, иммобилизация дрожжевых клеток, что делает производственный процесс непрерывным, а также получение новых культур сбраживания микроорганизмов методами генной инженерии.

#### *Получение метана и других углеводородов.*

Второй энергетический продукт, производство которого налажено в ряде стран (например, в Китае) – метан. При переработке сырья в анаэробных условиях под действием микроорганизмов образуется смесь газов, главным образом метан и диоксид углерода. В газовых реакторах используются отходы сельского хозяйства, испорченные продукты, жидкие стоки сахарных, масло- и спиртозаводов, древесные отходы. Существуют крупные промышленные газореакторные установки, распо-

ложенные обычно вблизи предприятий по переработке сельскохозяйственной продукции, и небольшие бытовые реакторы. В Китае работают около 10 млн реакторов, каждый из которых рассчитан на одну семью. Неочищенный газ используют для приготовления пищи и освещения, но при выработке в больших количествах его можно использовать в качестве топлива на электростанциях или для заправки машин и тракторов. Для подачи в газораспределительную сеть его очищают от углекислоты и сероводорода. Наряду с получением энергоносителя био-реакторы выполняют важную роль в переработке бытовых отходов, навоза и мусора.

Получение газа происходит при участии разных популяций микроорганизмов. Одни из них расщепляют полимеры, вторые образуют летучие жирные кислоты, в том числе уксусную кислоту, а также водород и диоксид углерода, а третьи (метанобразующие бактерии) – метан. Первая группа микробов расщепляет жиры, белки и целлюлозу. Процесс идет, обычно при 30–40°C и pH 6–7 (условия, оптимальные для мезофильных бактерий). При снижении температуры до 20°C, (при которой могут расти психрофильные микроорганизмы) процесс пойдет медленнее. Повышение температуры ферментации до 50–60°C (оптимальные условия для термофильных бактерий) приводит к значительному ускорению процесса, но вызывает дополнительный расход энергии (сжигание части получаемого газа). В результате реакций гидролиза образуются жирные кислоты, аминокислоты и моносахариды, которые используются микробами второй группы, образующими различные органические кислоты: молочную, пропионовую, уксусную.

Уксусная кислота является главным субстратом для образования метана. Метан образуется также из водорода и диоксида углерода. Источником азота для растущих бактерий могут служить соли аммония. Ингибируют процесс метанообразования кислород, нитриты, нитраты, сульфиды, цианиды, сероводород, ионы тяжелых металлов. Необходимыми условиями эффективной работы реакторов является поддержание оптимальных для используемых культур микроорганизмов значений температуры и pH. В зависимости от состава используемого сырья энергетический выход получения метана в биореакторах составляет 20–50 %. Теоретическая эффективность образования метана из глюкозы – более 90 %. Обычно биогаз содержит до 70 % метана. Его очистка требует дополнительных расходов, снижающих энергетическую эффективность. Тем не менее, биотехнологическое получение метана (биогаза) является экономически выгодным, так как при этом не только используется сырье, не имеющее коммерческой ценности, но и решается проблема утилизации отходов.

Дальнейший прогресс в этом направлении требует изучения и рационального подбора микроорганизмов для ферментации, совершенствования способов заправки сырья и теплообеспечения, измерения объемов газа, а также разработка новых производственных процессов систем контроля. Роль методов биотехнологии в переработке промышленных отходов огромна. В развитых странах миллионы тонн отходов пищевого производства (молочная сыворотка, барда, отходы животноводства и другие) перерабатываются с применением методов промышленной биотехнологии.

Кроме метаногенных анаэробов существует другая группа организмов – продуцентов углеводов как заменителей топлива. Это микроводоросли – *Botryacoccus*, *Isochrysis*, *Nanochloropsis* и др. Углеводороды накапливаются в значительных количествах – до 80 % сухой массы клеток. В США действует ферма для выращивания водорослей с суммарной площадью водоемов 52 тыс. гектаров, дающая около 4800 м<sup>3</sup> жидких углеводородов в сутки. Для улучшения топливных характеристик полученные из водорослей углеводороды подвергают гидрированию.

#### *Получение водорода как топлива будущего*

Получение водорода как топлива пока остается на уровне поисковых разработок. Это абсолютно чистое топливо, дающее при сгорании лишь H<sub>2</sub>O, отличается исключительно высокой теплотворной способностью – 143 кДж/г. Химический и электрохимический способы получения H<sub>2</sub> неэкономичны, поэтому заманчиво использование микроорганизмов, способных выделять водород. Такой способностью обладают аэробные и анаэробные хемотрофные бактерии, пурпурные и зеленые фототрофные бактерии, цианобактерии, различные водоросли и некоторые простейшие. Процесс протекает с участием гидрогеназы или нитрогеназы.

В Японии получен штамм *Anabaena sp.*, который осуществляет биофототоллиз воды в режиме, не чувствительном к H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> и N<sub>2</sub>. Повышению эффективности биофототоллиза воды способствует чередование периодов функционирования биообъекта как продуцента H<sub>2</sub> и O<sub>2</sub> с периодами «отдыха», когда клетки фотоассимилируют CO<sub>2</sub> (вводимый на этот период в среду культивирования). Возможно комбинирование процессов получения H<sub>2</sub> и других ценных продуктов. В частности, представители рода *Clostridium* дают органические растворители и в то же время обладают активной гидрогеназой. Если в реакторе с культурой *Cl. saccharoperbutylacetonicum* не создавать оттока для выделяющегося H<sub>2</sub>, то наблюдается ингибирование образования H<sub>2</sub> и эффективный синтез бутанола, ацетона и этанола. Если водороду обеспечивают свободный отток, то наряду с довольно активным образованием H<sub>2</sub> культура синте-

зирует лишь этанол. Этот пример иллюстрирует возможность управления ходом биотехнологического процесса условиями культивирования биообъекта.

*Пути повышения эффективности фотосинтетических систем.* Рассчитанная теоретически эффективность фотосинтеза, т. е. коэффициент превращения световой энергии в химическую энергию органических веществ, близка к 15 %. Фактически, однако, наиболее продуктивные культурные растения запасают не более 1,5–2 % энергии падающего света. Актуальная проблема технологической биоэнергетики – повышение эффективности фотосинтеза у культурных растений.

Радикальным способом максимизации эффективности фотосинтеза было бы создание искусственных фотосистем, имитирующих основные блоки фотосинтетического аппарата живых организмов, но внедрение подобных преобразователей энергии, по-видимому, отделено от нас несколькими десятилетиями.

#### *Биотопливные элементы*

Наиболее перспективным направлением биоэнергетики является создание биотопливных элементов, преобразующих энергию света в электрическую энергию. Это стало возможным после открытия в конце XIX века превращения химической энергии в электрическую, а также обнаружения в XX веке движения электронов в живых организмах при дыхании, фотосинтезе и других окислительно-восстановительных процессах. Принцип преобразования энергии окислительно-восстановительных реакций в электрическую в настоящее время широко используется в датчиках и анализаторах. Они используются для определения концентраций глюкозы, спирта и других веществ в крови, выдыхаемом воздухе и других биосредах. Механизм генерации электрических импульсов широко распространен в биосфере, он доведен до совершенства у электрических скатов, угрей и некоторых других животных.

Впервые получил электрический ток биологического происхождения английский ботаник С. М. Поттер в 1910 г. Погрузив один платиновый электрод в анаэробную культуру кишечной палочки, а другой – в стерильную аэробную среду, он зарегистрировал слабый электрический ток напряжением 0,3–0,5В, силой 0,2 мА. За последние годы разработаны разные типы регенерируемых (самовосстанавливающихся) биотопливных элементов, в которых используется энергия глюкозы, спиртов и других субстратов, окисляющихся при участии ферментов (дегидрогеназ) микроорганизмов.

Электроны и протоны, образующиеся при окислении биосубстратов, движутся раздельно по системам переносчиков, соответственно, к аноду и к катоду благодаря ионоселективности (избирательной про-

пускной способности) биологических мембран. При замыкании цепи в ней возникает электрический ток. Наиболее совершенные биоэлектрические элементы дают плотность тока до 40 мА/см<sup>2</sup> и мощность 1 кВт и являются экономически выгодными. Они могут работать от нескольких недель до месяцев. Теоретически в качестве топлива в таких реакторах можно использовать любые вещества, в том числе содержащиеся в бытовых и промышленных отходах, на которых способны расти микробы. Вероятно, в скором времени они будут внедрены в практику.

Примерами могут служить топливные элементы на основе окисления метанола в муравьиную кислоту с участием алкогольдегидрогеназы, муравьиной кислоты в  $\text{CO}_2$  с участием форматдегидрогеназы, глюкозы в глюконовую кислоту с участием глюкозооксидазы. Используют также каталитическую активность целых клеток, например *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, в реакции окисления глюкозы.

Окисление субстрата происходит на электроде (аноде). Посредником между субстратом и анодом является биокатализатор. Существуют два пути дальнейшей передачи электронов на электрод:

- 1) с участием медиатора;
- 2) непосредственный транспорт электронов на электрод.

Конструкция биотопливного элемента позволяет генерировать не только электрический ток, но и осуществлять важные химические превращения. Например, топливный элемент с глюкозооксидазой и р-D-фруктофуранидазой переводит сахарозу в смесь фруктозы и глюконовой кислоты.

В настоящее время крупнейшие биотехнологические фирмы работают над созданием фотобиоэлектрических элементов. Как ожидается, эти элементы совершат переворот в биоэнергетике. В них используются фотосинтезирующие микроорганизмы, в хлоропластах которых возбужденные под действием света электроны транспортируются по системе переносчиков непосредственно на анод, а протоны – на катод, создавая электрический ток при замыкании цепи по схеме, аналогичной предыдущей.

Перспективы получения и использования биотоплива остаются предметом острых дискуссий во всем мире. Важно отметить, что основные участники этой дискуссии активно развивают у себя производство биотоплива, стимулируют рынки и финансируют научно-исследовательские программы в данной области. В 2009 г. США завершили строительство 40 заводов по производству биотоплива и в 2010 г. по объему производства и потребления биотоплива уже опередили Бразилию.

Научный поиск и внедрение новых инженерных решений в этой области продолжается, причем, главным результатом, сейчас является не вытеснение нефти, а получение огромного опыта трансформации биологического сырья в разнообразную промышленную продукцию. Мировое потребление биотоплива, как жидкого, так и твердого растет темпами, превышающими 10% в год. Практически во всех странах мира, как развитых, так и развивающихся, приняты биоэнергетические программы.

### Инженерная энзимология

Химическая и инженерная энзимология возникла на стыке молекулярной биологии, физической химии и энзимологии. Это наука о создании биоорганических катализаторов, в которых использованы принципы действия активных центров ферментов.

Одним из ярких примеров применения биокатализатора является его использование в тонком органическом синтезе. Уникальная специфичность и стереоспецифичность действия ферментов, возможность проведения процессов в «мягких» условиях, протекание реакции с высокой скоростью при использовании незначительных количеств катализатора, практическое отсутствие побочных реакций – все это делает биокаталитические процессы чрезвычайно привлекательными при получении лекарственных субстанций. Поэтому в настоящее время биотехнология может успешно конкурировать с тонкими химическими технологиями на отдельных этапах приготовления лекарственного препарата.

*Ферментативная модификация  $\beta$ -лактамных антибиотиков.* Получение новых, более эффективных аналогов пенициллина, связано с изменением его боковой цепи при сохранении целостности остальной части, так называемого ядра антибиотика – 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). Поскольку масштабный химический синтез таких соединений невозможен, самым простым путем проведения необходимого превращения является отщепление боковой цепи биосинтетического пенициллина, выделение 6-АПК и последующее ацилирование ее аминогруппы с получением «полусинтетического» аналога.

Подобное превращение может быть проведено в одну стадию и в самых обычных условиях при 10–40°C в водной среде использованием специфического фермента – пенициллинамидазы.

С использованием иммобилизованной пенициллинамидазы связан еще один процесс инженерной энзимологии – получение 7-аминодезацетоксицефалоспоровановой кислоты, ключевого соединения для синтеза новых цефалоспоринов.

*Ферментативное превращение рацематов в энантиомеры.* Примером практического использования биокатализа служит ферментативное превращение рацематов в энантиомеры аминокислот. При помощи ацилаз можно разделить рацемические смеси большинства аминокислот. Ацилазы аминокислот – широко распространенные ферменты, содержащиеся в тканях животных (ацилаза из почек свиньи хорошо изучена и широко используется), в растениях и микроорганизмах.

Разделять рацемические смеси аминокислот можно, используя не только ацилазы, но также и ряд протеолитических ферментов, обладающих высокой стереоспецифичностью в реакции гидролиза сложных эфиров аминокислот.

К перспективному способу получения оптически чистых аминокислот относится энантиоселективное ферментативное превращение и аминокислоты ряда циклических производных, химический синтез рацематов которых представляет собой более легкую задачу, чем получение рацемата самой аминокислоты. Подобно тому, как аминокислазы и некоторые протеазы используются для получения энантиомеров аминокислот, многие другие гидролитические ферменты могут применяться для получения различных оптических изомеров сложных органических соединений.

*Биокаталитическое получение простагландинов.* Простагландины являются гидроксилированными продуктами превращения в организме полиненасыщенных жирных кислот. Они состоят из 20 атомов углерода и включают циклопентановое кольцо. В зависимости от структуры пятичленного кольца все простагландины делят на четыре группы: А, В, Е и F, а в зависимости от числа двойных связей в метильной и карбоксильной боковых цепях в каждой из групп различают индивидуальные простагландины, обозначаемые буквой, выражающей принадлежность к группе, и цифрой, показывающей число двойных связей в боковых цепях ( $A_1$ ,  $A_2$  и т. д.). В организме простагландины синтезируются из полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) посредством специальной ферментной системы (простагландинсинтетаза), фиксированной в микросомальных мембранах. Источниками субстрата для биосинтеза простагландинов в организме являются фосфолипиды клеточных мембран, триглицериды, этирифицированный холестерин, высвобождающие свободные полиненасыщенные жирные кислоты активированной ферментной системой (ацилгидролазы) в ответ на нейрогуморальную стимуляцию. Наиболее распространенным субстратом простагландинсинтетазы является арахидоновая кислота, содержащаяся в фосфолипидной фракции клеточных мембран практически всех клеток животных организмов.

Переход арахидоновой (5,8,11,14-эйкозатетраеновой) кислоты в простагландины, тромбоксаны и простаглицлин осуществляют сложные полиферментные системы. Ключевым ферментом синтеза следует считать общий для всех этих соединений первый фермент цепи – простагландинэндопероксидсинтетазу. Этот фермент катализирует образование простагландина  $H_2$  – общего промежуточного соединения при получении всех простагландинов, тромбоксанов и простаглицлина.

Простагландины и их основные предшественники ПНЖК (арахидоновая, эйкозатетраеновая, эйкозатриеновая) содержатся во всех тканях млекопитающих в очень малых количествах. Наибольшим содержанием характеризуется семенная жидкость млекопитающих и человека, предстательная железа, а также эндометрий матки и яичников. ПГ найдены в мозговой ткани различных животных и человека, слизистой оболочке желудка и кишечника, селезенке, почках, печени, поджелудочной железе, мышечной ткани, радужной оболочке.

Простагландинэндопероксидсинтаза – гемсодержащий фермент, катализирующий трехсубстратную реакцию, в ходе которой происходит сопряженное окисление кислородом арахидоновой кислоты и какого-либо донора электронов. Донорами электронов могут служить слабые органические и неорганические восстановители, например ферроцианид, адреналин, триптофан, НАДН<sub>2</sub>.

Лейкотриены представляют собой соединения, играющие важную роль при протекании воспалительных процессов, бронхиальной астмы, регуляции адгезии и агрегации нейтрофилов, полиморфноядерных лейкоцитов и т. д. Арахидоновая кислота может быть получена из подходящих масс биокаталитическим путем с использованием специфических фосфолипаз.

Конверсия ПНЖК в организме под влиянием специфической простагландинсинтазы осуществляется через образование эндоперексидей простагландинов с включением двух молекул кислорода. Образующиеся короткоживущие промежуточные соединения (эндоперексиды) под воздействием других ферментных систем могут образовывать не только соответствующие простагландины, но и другие биологически активные вещества специфического спектра действия для ряда тканей. Так, при специфической энзиматической циклизации арахидоновой кислоты образуются эндоперексиды (простагландинны  $G_2$  и  $H_2$ , ППТ<sub>2</sub> и ПГН<sub>2</sub>), которые далее трансформируются в простагландины  $E_2$ ,  $D_2$ ,  $F_{2d}$ . В случае каталитического воздействия на эндоперексиды фермента тромбоксансинтазы, локализованной в мембранах микросом тромбоцитов, образуются тромбоксаны ( $A_2, B_2$ ) – вещества с исключительно выраженными адгезионными свойствами. При воздействии на эти же вещества ферментной

системы микросомальной фракции артериальных сосудов биосинтез идет в направлении образования простаглицлина (ПГ<sub>И2</sub> и ПГ<sub>Х</sub>) – веществах, характеризующихся мощным антиадгезионным и деагрегирующим эффектом, в десятки раз превосходящим антитромбическую активность ПГЕ<sub>1</sub> и ПГД<sub>2</sub>

Простаглицлины синтезируются практически всеми тканями животного организма. Их можно рассматривать как производные «простановой кислоты», не существующей в природе, но полученной синтетически.

ПНЖК, непосредственно являющиеся предшественниками биосинтеза простаглицлинов – арахидоновая и  $\gamma$ -линоленовая кислоты, содержатся в продуктах питания в крайне малых количествах и чаще всего отсутствуют. Эти вещества синтезируются в организме из поступающих с пищей  $\gamma$ -линоленовой и линолевой (эссенциальные жирные кислоты). При этом происходит ферментативное удлинение углеродного скелета ЭЖК на два метиленовых звена за счет «пристраивания» ацетатного фрагмента с образованием цепочки из 20 углеродных атомов. Все продукты, являющиеся метаболитами ПНЖК с сохранением длины углеродного скелета, обобщенно называются эйкозаноидами по наименованию соответствующего греческого числительного. Нужно отметить, что арахидоновая кислота преобладает в составе ПНЖК, тогда как концентрации

$\gamma$ -линоленовой на порядок, а тиленодовой (или эйкозапентаеновой) – на два порядка ниже. Вновь синтезированная арахидоновая кислота немедленно связывается в мембранные фосфолипиды, которые и являются депо предшественников простаглицлинов в организме.

Одним из сложных аспектов изучения простаглицлинов является выявление их роли в образовании и функциях циклического 3',5' – аденозинмонофосфата (цАМФ), который занимает центральное место во внутриклеточных регуляторных механизмах.

Простаглицлины в зависимости от вида ткани и разновидности аденилатциклазы могут как стимулировать (наблюдается чаще всего), так и ингибировать синтез цАМФ. Так, например, именно угнетением аденилатциклазы, катализирующей синтез цАМФ спонтанно или индуцированно норадреналином, глюкагоном и активацией симпатической нервной системы и объясняется антимиоматический эффект ПГЕ<sub>1</sub>. Имеются данные, указывающие на ингибирующее влияние ПГЕ<sub>1</sub> на образование цАМФ под воздействием вазопрессина через систему аденилатциклазы. Простаглицлины достоверно снижают содержание цАМФ в слизистой оболочке желудка, жировых клетках, тканях собирающих канальцев почек и в некоторых структурах центральной нерв-

ной системы. В большинстве тканей простагландины активируют синтез цАМФ. ПГЕ<sub>1</sub> оказывает стимулирующее влияние на синтез гормона роста, вазопрессина, тиреотропина. Простагландины E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> и E<sub>2α</sub> стимулируют биосинтез стероидов; простагландины E<sub>2</sub> и E<sub>2α</sub> способствуют высвобождению окситоцина и увеличивают содержание в крови пролактина. Таким образом, они оказывают влияние на важнейшие эндокринные железы животных и человека: гипофиз, кору надпочечников, щитовидную железу, яичники.

Существующие в настоящее время способы получения простагландинов можно подразделить на три группы: 1) выделение, 2) биосинтез и 3) синтез.

Выделение из животного сырья было единственным способом получения ПГ в незначительных количествах. Первые экстракты, выделенные в 1906 и 1913 гг. из предстательных желез собаки и человека, представляли собой неочищенные фракции. В основе этих способов выделения лежала обработка сырья водно-спиртовым раствором метанола, этанола, изопропанола с последующим переводом извлеченных веществ в неводный растворитель (хлороформ, метилхлорид, эфир, этилацетат, бензол).

В последующем стали применять более полное разделение вытяжек путем распределения между несмешивающимися растворителями, используя неводные растворители и буферные растворы. Получение кристаллических простагландинов осуществляют путем экстракции, концентрирования, фракционирования и других необходимых операций, проводимых в мягких условиях при определенных значениях pH и температуры. Полученные экстракты упаривают в вакууме до сухого состояния и подвергают распределительной хроматографии и кристаллизации.

**Биосинтез.** С целью получения простагландинов в промышленных масштабах в настоящее время применяется синтез *in vitro*. В зависимости от условий проведения биосинтеза и количества вводимых ингредиентов можно получить простагландины массой от нанограммов до сотен граммов.

Основными компонентами осуществления биосинтеза с целью их производства являются: предшественники, ферменты, pH среды и тип буфера, концентрация кислорода, наличие кофакторов и ингибиторов.

**Синтез.** Первые шаги в направлении осуществления полного химического синтеза простагландинов были разработаны 2 различных способа синтеза ненасыщенного кетона, являющегося продуктом гидрогенизации ПГЕ<sub>1</sub> (1963 г). Этот путь получения вещества, имеющего скелет простаноевой кислоты, предшествовал последующим работам и области

химического синтеза ПГЕ1 В настоящее время синтетическим путем получают большое количество производных простагландинов – их аналогов и гомологов, в том числе соединения с укороченными алкильными цепями, соединения, этерифицированные в положениях C<sub>11</sub> и C<sub>15</sub>, соединения, содержащие вместо циклопентанового ядра циклогексановое.

Известно, что некоторые микроорганизмы могут трансформировать арахидоновую кислоту в простагландины. Трансформацию арахидоновой кислоты штаммом *Fussarium sambucinum* (штамм ВКМФ-842) проводят на питательной среде, содержащей дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт, пептон в стерильных условиях при 26°C на качалке 240 об/мин в течение 36–48 ч. Выделение целевого продукта проводят жидкостной адсорбционно–распределительной хроматографией. При добавлении арахидоновой кислоты в питательную среду мицелия гриба *Fussarium sambucinum* происходит трансформация АК в ПГЕ<sub>2</sub> и F<sub>2α</sub>, общий выход которой составляет 18 %.

### Сельскохозяйственная биотехнология

В сельском хозяйстве биологические препараты для лечения, профилактики и диагностики заболеваний представлены широким ассортиментом продуктов. По оценкам экспертов, дальнейшее наращивание физических объемов производства в агросекторе имеет серьезные ограничения на мировых рынках: в определенный момент дальнейший рост объемов без изменения технологических подходов (условий выращивания, хранения и транспортировки в растениеводстве, условий содержания, кормления и переработки в животноводстве) станет невозможным. Использование биотехнологии в сельском хозяйстве ориентировано на стабильное развитие сельскохозяйственного производства, решение проблемы продовольственной безопасности, получение высококачественных, экологически чистых продуктов питания, переработку отходов сельско-хозяйственного производства, восстановление плодородия почв.

В данном направлении наиболее приоритетным является:

- создание новых сортов сельскохозяйственных растений и животных с использованием современных постгеномных и биотехнологических методов;
- разработка и внедрение методов геномной паспортизации для повышения эффективности селекционно-племенной работы, технологий клонирования животных–производителей;
- производство биопрепаратов для растениеводства;

- производство кормовых добавок для сельскохозяйственных животных;
- производство ветеринарных биопрепаратов.

*Биологическая защита растений.* В течение последних 10 лет методами биотехнологии удалось создать новые поколения биологических средств защиты растений, которые по стоимостным характеристикам вполне могут конкурировать с химическими средствами защиты. В результате наблюдается масштабный рост объемов применения биологических средств практически во всех крупных аграрных регионах мира.

Меры биологической защиты растений позволяют повысить урожайность, снизить потери в растениеводстве, внедрить интегрированные системы защиты растений. Они ведут к снижению остатков действующего вещества в конечной продукции, что крайне важно при контроле в странах-импортерах российской сельскохозяйственной продукции (на данном этапе – зерновых). В Европейском Союзе в настоящее время действует директива, утвердившая программу REACH, определяющую резкое повышение требований к использованию химикатов (причем не только в сельском хозяйстве). Развитие направления биологической защиты растений ведет к значительному снижению химической нагрузки на растениеводство, способствуя долгосрочной конкурентоспособности сектора.

### **Экологическая биотехнология**

Экобиотехнология – сравнительно новое направление науки – представляет собой область междисциплинарных знаний биологии, химии и геохимии, экологии, почвоведения, гидробиологии, микробиологии, биохимии и физиологии, популяционной генетики, инженерно-технологических дисциплин.

Одно из важнейших направлений экобиотехнологий – решение задач охраны окружающей среды с использованием живых организмов и систем для переработки отходов, очистки природных сред от техногенных загрязнений, обезвреживания загрязненных техногенных потоков, восстановления плодородия земель, выведенных из хозяйственного пользования в результате деятельности человека, замены химических препаратов сельскохозяйственного назначения экологически чистыми биологическими, получения и модификации «экологически дружественных» полимеров, ПАВ и других материалов и соединений с полезными свойствами, а также предотвращение биокоррозии, биоповреждений и биообрастаний.

Экобиотехнология связана с использованием таких традиционных процессов, как биологическая очистка сточных вод, переработка органических отходов (приготовление компостов и др.), а также сравнительно новых, применяемых для очистки газовоздушных выбросов, загрязненных почв, водоемов, донного ила, осадков. Биотехнологические способы очистки природных сред, в частности почв и грунта от загрязнений, обезвреживания токсичных отходов в природных средах, называются методами биоремедиации.

Для решения экологических проблем способами биотехнологии используют главным образом эволюционно сложившиеся функции микроорганизмов: их роль в биогеохимическом круговороте веществ в природе, в процессах самоочищения экосистем, деградации техногенных загрязнений, в образовании почвенного гумуса, минерализации ежегодно образующейся массы органических веществ, природных биополимеров и др. Участие микроорганизмов в минерализации органических соединений обусловлено их повсеместным присутствием в окружающей среде и высоким потенциалом катаболизировать органические соединения, попавшие в биосферу. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что большинство природных и искусственных материалов подвергается биологической трансформации. Однако для протекания биотрансформации с заметной скоростью необходимы оптимальные условия для жизнедеятельности микроорганизмов.

В настоящее время селекционированы микроорганизмы, способные активно разлагать многие загрязнения, как природные биополимеры и их аналоги, так и ксенобиотики (нефть и нефтепродукты, полимеры, хлорорганические соединения, тринитротолуол и др.), которые считались ранее устойчивыми к биodeградации.

Большие возможности открывает генная инженерия микроорганизмов, создание генетически модифицированных микроорганизмов, способных деградировать поллютанты, которые природными штаммами не деградируются или деградируются крайне медленно. Ряд биотехнологических фирм активно разрабатывает различные способы применения биореакторов и генетически модифицированных бактерий для деградации опасных веществ.

Биологическая очистка, ремедиация или переработка отходов более длительна, но эффективнее и экономичнее, чем физические и химические методы, и сокращает образование вторичных отходов.

Основная роль в деградации хлорированных производных принадлежит микроорганизмам – деструкторам, способным утилизировать труднорастворимые вещества, что обеспечивается наличием в них специфических ферментных систем. Поиск и исследования свойств микро-

организмов, утилизирующих синтетические соединения, в настоящее время привлекают все большее внимание, так как биологическая очистка является наиболее эффективным, и экологически безопасным методом. В связи с этим особую актуальность приобретают исследования, посвященные изучению природных сообществ микроорганизмов и определению их роли в конверсии органических соединений.

Использование биологических технологий представляется наиболее перспективным. Скорость и эффективность процессов конверсии опасных веществ определяется свойствами и активностью микроорганизмов-деструкторов. По оценкам специалистов микробиологический способ примерно в 50 раз дешевле стандартных методов. Использование микроорганизмов позволяет решить проблему вторичных загрязнений, т. к. разрушение ксенобиотиков можно провести без накопления вредных или токсичных веществ. Кроме этого, с использованием специальных штаммов, возможно, осуществить обезвреживание.

Биологические методы очистки применяются для очистки хозяйственно-бытовых и промышленных сточных вод от многих растворенных органических и некоторых неорганических веществ (сероводорода, сульфидов, аммиака, нитратов и др.). Процесс очистки основан на способности микроорганизмов использовать эти вещества для питания. Контактная с органическими веществами? микроорганизмы частично разрушают их, превращая в воду, диоксид углерода, нитрит, сульфатионы и др. Органические вещества для микроорганизмов являются источником углерода. Разрушение органических веществ с помощью микроорганизмов называют биохимическим окислением.

Все применяемые методы очистки сточных вод от органических загрязнений и неокисленных минеральных соединений с помощью микроорганизмов разделяются на анаэробные и аэробные.

Анаэробные микробиологические процессы осуществляются при минерализации как растворенных органических веществ, так и твердой фазы сточных вод. Анаэробные процессы протекают в замедленном темпе, идут без доступа кислорода, используются, главным образом, для сбраживания осадков.

Аэробный метод очистки основан на использовании аэробных групп микроорганизмов, для жизнедеятельности которых необходим постоянный приток кислорода и температура 20–40°C. При изменении кислородного и температурного режимов состав и количество микроорганизмов меняется.

Аэробные процессы очистки применяются преимущественно для минерализации органических веществ, растворенных в жидкой фазе сточных вод. Некоторые органические вещества легко поддаются

биологическому окислению, а некоторые окисляются очень трудно или не окисляются совсем. Для установления возможности подачи промышленных сточных вод на биологические очистные сооружения устанавливаются максимальные концентрации органических веществ, которые не влияют на процессы биологического окисления и на работу очистных сооружений.

Микробиологическая сульфатредукция протекает и анаэробных условиях и приводит к образованию сероводорода из сульфат-ионов и осаждению тяжелых металлов в виде сульфидов. Осаждение сульфидов может происходить вне клеток микроорганизмов, в клетках или на поверхности клеток при pH от 3,0 до 9,0, предпочтительно при pH 7,0–8,0. Сульфатредукция может быть проведена в отстойниках, лагунах, биопрудах, анаэробных реакторах.

Для аэробной очистки воды от железа и марганца в реактор чаще всего с фильтрующей загрузкой высевают колонии бактерий (например, *Galionella*, *Clonothrix*, *Leptothrix*, *Metallogenium*), окисляющих железо и марганец.

Микробиологическое осаждение мышьяка основано на окислении As(III) в As(V). Этот процесс протекает в аэробных условиях с участием бактерий *Pseudomonas putida*, *Aeromonas dechromatica* и др.

Водоросли также способны связывать значительные количества тяжелых металлов и радионуклидов. Клетки *Chlorella regularis*, иммобилизованные в полиакриламидном геле, эффективны в сорбции урана и свинца; биомасса *Chorella vulgaris* – золота, серебра, меди, ртути; *Chlorella pyrenoidosa* – свинца и золота. Кремниево-водорослевые композиты сорбентов с иммобилизованными клетками *Ch. vulgaris* последовательно извлекают из смеси  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  сначала цинк, затем медь и ртуть. Водоросли pp. *Chlorella*, *Scenedesmus acutus*, цианобактерии *Nostoc muscorum*, способные избирательно улавливать Cd, Au, Ni, Zn, иммобилизованные на матрицах, служащих одновременно фильтрами, предложено использовать для извлечения металлов из отходов горнодобывающей промышленности и металлургического производства.

Активный ил в основном образован биомассой одноклеточных организмов. По содержанию белка он близок к белково-витаминным концентратам (БВК), получаемым культивированием дрожжей рода *Candida* на гидролизатах целлюлозных отходов или парафинах нефти.

Нефтяное загрязнение – как по масштабам, так и по токсичности представляет собой общепланетарную опасность. Нефть и нефтепродукты вызывают отравление, гибель организмов и деградацию почв. Естественное самоочищение природных объектов от нефтяного загрязнения – длительный процесс, особенно в условиях пониженного темпе-

ратурного режима. Поэтому проблема рекультивации почв, загрязненных нефтью, очень актуальна.

Ежегодно Казахстан добывает более 50 млн тонн сырой нефти и более 10,5 млн газоконденсата, занимая 12-е место в мире по разведанным запасам нефти и конденсата, а в рейтинге ведущих нефтедобывающих держав находится на 23-ем месте. Нефтегазоносные районы занимают площадь около 1,7 млн км<sup>2</sup>. К 2015 году Казахстан рассчитывает утроить добычу нефти, доведя ее до 150 млн т ежегодно и войти в десятку крупнейших нефтедобывающих стран мира.

Почвенный покров – основной элемент ландшафта – первым принимает на себя «экологический удар». В связи с механическим нарушением и нередко химическим загрязнением происходит постепенная деградация почв, которая стала одной из основных экологических проблем нефтегазового комплекса.

На разложение нефти в почве решающим образом влияет функциональная активность комплекса почвенных микроорганизмов (*Pseudomonas* и *Rhodococcus*), обеспечивающих полную минерализацию нефти и нефтепродуктов до углекислого газа и воды. На первой стадии изменение почвенной биоты характеризуется массовой гибелью мезо- и микрофауны; на второй стадии – «бумом» микробиологической активности специализированных микроорганизмов и последующей постепенной эволюцией биоценоза, коррелирующей с постоянно изменяющейся геохимической ситуацией в почве.

Токсичность ароматических углеводородов для микроорганизмов почвы и их негативное воздействие на ферментативную активность различна. Наиболее чувствительными к загрязнению ароматическими углеводородами являются нитрифицирующие и целлюлозоразрушающие микроорганизмы, которые могут служить индикаторами загрязнения почв.

Показано, что загрязнение нефтью приводит к существенному (на два порядка) снижению численности гетеротрофной части микробного комплекса, отмеченного на начальных этапах воздействия нефти. Через три месяца происходит восстановление численности гетеротрофов.

*Биологическая очистка почв in situ* (прямо на месте).

Главное преимущество обработки *in situ* – технология позволяет обрабатывать почву без ее извлечения и транспортировки, что снижает финансовые расходы. Но такая обработка требует большего времени и имеет меньше уверенности в единообразии обработки из-за изменчивости свойств почвы и водоносного горизонта, а также трудно провести эффективность процесса.

Технологии биовосстановления являются технологиями разрушения, целью которых является стимулирование роста микроорганизмов и использование загрязнителей в качестве источника пищи и энергии для создания благоприятных условий. Иногда для ускорения процесса используются заранее выращенные микроорганизмы, приспособленные для разложения специфических загрязнителей. Хотя не все органические соединения поддаются биоразложению, технологии биовосстановления были с успехом применены для очистки почв, илов и грунтовой воды, загрязненных углеводородами нефти, растворителями, пестицидами, консервантами древесины и др. Биовосстановление неприменимо для обработки неорганических загрязнений.

*Микроорганизмы-деструкторы нефти и нефтепродуктов.* Способность усваивать углеводороды нефти присуща микроорганизмам, представленным различными систематическими группами. К ним относятся различные виды миксомицетов, дрожжей и бактерий. Наиболее активные деструкторы нефти встречаются среди бактерий. Они характеризуются способностью к усвоению широкого спектра углеводов, включая и ароматические, обладают высокой скоростью роста и, следовательно, представляют большой практический интерес.

Углеводородокисляющая группа микроорганизмов природного происхождения таксономически очень разнообразна. Наиболее активные бактериальные штаммы относятся к родам: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Sphaerotilus*. Среди актиномицетов внимание привлекает многочисленный род *Streptomyces*. Из дрожжей выделяют род *Candida* и *Torulopsis*.

В настоящее время активно ведется поиск микроорганизмов, разрушающих нефть, в особенности при низких температурах. Активные формы микроорганизмов выделяются из разнообразных водных и почвенных экосистем, особенно загрязненных углеводородами или нефтью, а также из микрофлоры нефти и пластовых вод нефтяных месторождений.

Одной из бурно развивающихся отраслей биотехнологии считается *технология микробного синтеза ценных для человека веществ*. По прогнозам, дальнейшее развитие этой отрасли повлечет за собой перераспределение ролей растениеводства и животноводства с одной стороны, и микробного синтеза – с другой, в формировании продовольственной базы человечества.

Ведутся работы по созданию биополимеров, которые будут способны заменить современные пластмассы. Эти биополимеры имеют существенное преимущество перед традиционными материалами, так как нетоксичны и подвержены биодegradации, то есть легко разлагаются после их использования, не загрязняя окружающую среду.

### Выводы

Таким образом, как следует из вышеизложенного, в биотехнологических процессах возможно использование ряда биологических объектов, характеризующихся различными уровнями сложности биологической регуляции, например клеточным, субклеточным, молекулярным.

От особенностей конкретного биологического объекта самым непосредственным образом зависит подход к созданию всей биотехнологической системы в целом. В результате фундаментальных биологических исследований углубляются и расширяются знания о природе и, тем самым, о возможностях прикладного использования той или иной биотехнологической системы в качестве активного начала биотехнологического процесса. Набор биологических объектов непрерывно пополняется.

### Контрольные вопросы:

- 1 Как с помощью генноинженерных методов модифицировать *Zyotomonas mobilis*, чтобы можно было использовать этот микроорганизм для производства этанола из крахмала?
- 2 Взяв три штамма *Pseudomonas*, один из которых использует фенол в качестве единственного источника углерода при 0°C, второй расщепляет антрацен с образованием катехола при 35°C, а третий расщепляет п-толуол с образованием протокатехоата при 35°C, предложите стратегию создания штамма, который сможет использовать в качестве единственного источника углерода фенол, антрацен или п-толуол при 0°C.
- 3 Как повысить эффективность образования силоса, проводя манипуляции с *Lactobacillus plantarum*?
- 4 Как следует модифицировать бактерии рубца, чтобы они обеспечивали крупный рогатый скот незаменимыми аминокислотами?
- 5 Предложите несколько стратегий создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям.

# ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ ПО КУРСУ «ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №1

### **Техника работы с микроскопом. Микроскопирование. Техника работы с микробиологическими инструментами и лабораторной посудой**

**Цель работы:** изучить устройство микроскопа, технику работы при проведении микроскопировании и технику работы с микробиологическими инструментами и посудой при работе с культурой клеток.

#### **Устройство оптического микроскопа**

Наиболее удобным микроскопом, предназначенным для микроскопических исследований объектов в проходящем свете, является биологический микроскоп (МБИ-1, МБР-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6 серии «Биолам»), позволяющий исследовать микроорганизмы величиной не менее 0,2 микрона.

Биологический микроскоп состоит из следующих основных частей: механической, осветительной и оптической.

1. **Механическая часть** микроскопа состоит из штатива, тубусодержателя, тубуса, револьвера, предметного столика, подставки подковообразной, макрометрического и микрометрического винта.

**Штатив** имеет ножку подковообразной формы для придания микроскопу устойчивого положения. Штатив снабжен двумя сменными тубусами: одним наклонным — для визуальных наблюдений, другим — прямым для микрофотографирования и применения рисовального аппарата.

**Тубусодержатель** имеет форму дуги, что позволяет удобно брать микроскоп и обеспечивает горизонтальное положение предметного столика.

Тубус служит для крепления окуляра и объективов на строго определенном расстоянии от друга. В верхнюю часть тубуса вставляют окуляры.

**Револьвер** имеет 3–4 гнезда для ввинчивания объективов. При вращении пластины револьвера любой объектив может быть подведен под тубус и закреплен строго по оптической оси микроскопа; в револьвере имеется защелка, фиксирующая положение объектива.

**Макрометрический винт** или кремальера — механизм, для быстрого передвижения тубуса или грубой наводки. Вращая одну из

боковых головок этого винта по часовой стрелке, тубус опускают, против часовой стрелки – поднимают. При малом увеличении микроскопа пользуются только микровинтом.

**Микрометрический винт** – механизм для медленного опускания и подъема тубуса. Полный оборот этого винта продвигает тубус на 0,1 мм, а так как барабан винта разделен на 5 делений, то поворот на 1 деление передвигает тубус на 0,002 мм или 2. Получение изображения в фокусе объекта легко достигается передвижением микровинта на одно или несколько делений, которые отмечены на барабане, расположенном вокруг головки винта.

**Предметный столик микроскопа** имеет круглую форму. В центре имеется отверстие для прохождения лучей, освещающих препарат. Предметный столик снабжен двумя пружинящими зажимами для закрепления препарата или двумя винтами для перемещения препарата.

**Зеркало** отражает световые лучи и направляет освещение через конденсор в объектив микроскопа. Зеркало подвижное и двухстороннее: с одной стороны – плоское, им пользуются при естественном освещении и при работе с конденсором его поднимают до уровня предметного столика, с другой стороны – вогнутая, им пользуются при искусственном освещении и при работе без конденсора, т. е. его опускают до тех пор, пока при малом увеличении изображение источника света не появится в плоскости препарата.

**Конденсор** состоит из двух линз, при помощи которых лучи, идущие от зеркала, конденсируются и направляются на плоскость препарата. Конденсор помещается под предметный столик и может передвигаться зубчатой рейкой вверх и вниз.

Интенсивность света регулируется ирисовой диафрагмой, находящейся под конденсором, которая при помощи рычага может сужаться и расширяться наподобие зрачка глаза. При ярком освещении ее слегка суживают, при рассеянном свете расширяют. Окрашенные препараты исследуют с поднятым конденсором, достигая при этом полного освещения препарата. Живые микроорганизмы рассматривают с опущенным конденсором, при этом поле зрения затемняется и в силу разницы в преломлении света между средой и микробами, последние становятся контрастно видными.

**Объектив** наиболее важная и ценная часть микроскопа, определяющая его оптическую мощность.

Объектив состоит из ряда линз, склеенных канадским бальзамом и заключенных в металлическую трубку. Линза объектива, обращенная к предмету, называется фронтальной.

Биологические микроскопы обычно снабжаются тремя сменными объективами с увеличением в 8,40 и 90 крат. Объективы с увеличением 8 и 40 называются сухими, т.к. при пользовании ими между объективом и препаратом находится слой воздуха. При этом лучи света проходят среди различной плотности (показатель преломления воздуха  $n=1,52$ ), вследствие чего часть лучей преломляется и не попадает в объектив микроскопа. Поэтому сухими объективами можно пользоваться только при небольших увеличениях (до 400–600 раз).

Объектив с увеличением 8 применяют для общей ориентировки в препарате, 40 – для изучения дрожжей и микроскопических грибов, а так же подвижность бактерий.

Объектив, увеличивающий в 90 раз, называется иммерсионным объективом. Фронтальная линза иммерсионного объектива погружается в каплю иммерсионного масла (кедрового). Показатель преломления кедрового масла  $n=1,51$ , стекла  $n=1,52$  (т. е. погружая иммерсионный объектив в масло получаем оптически однородную среду). В этом случае лучи света, проходят среди одинаковой плотности, не рассеиваются и потому лучи света в иммерсионном объективе используется полнее, чем в сухой системе. Обычно иммерсионный объектив применяют при изучении морфологии бактерий. На объективах указаны их числовые апертуры – 0,20, 0,65, 1,25. .

Числовой апертурой называется произведение синуса самого большого угла, под которым свет может попадать под объектив и показателя преломления среды, находящегося между объективом и предметом.

Чем больше угол, под которым проникает свет в объектив, тем больше его разрешающая способность, т. е. способность изображать мельчайшие детали препарата. Разрешающая способность микроскопа тем больше, чем больше числовая апертура объектива и чем короче длина волны света, применяемого для наблюдения.

**Окуляр.** Изображение, делаемое объективом, рассматривают с помощью окуляра, находящегося в верхней части тубуса микроскопа. Окуляр состоит из двух линз, заключенных в металлическую оправку: верхней – глазной и нижней – собирающей. Между линзами в окуляре имеется диафрагма, которая задерживает боковые лучи и пропускает лучи, близкие к оптической оси и дающие более контрастные промежуточное изображение. Биологические микроскопы имеют три сменных окуляра с увеличением в 7,10 и 15 раз.

Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения окуляра на увеличение объектива. Применяя различные комбинаций объективов и окуляров можно получить увеличение от 56 до 135.

## Техника микроскопирования

1. При микроскопировании необходимо установить правильное освещение. Наиболее целесообразным является использование рассеянного солнечного света. Поиск света ведут при малом увеличении микроскопа. Степень освещения устанавливается с помощью зеркал и конденсора, при этом она должна быть тем больше, чем сильнее применяемое при микроскопировании увеличение.

2. На предметный столик микроскопа помещают препарат, закрепляют его зажимами и приступают к его изучению.

3. Изучение любого препарата необходимо начинать с малого объекта сухой системы (увеличение 8х). Это дает возможность видеть большой участок для более детального изучения. Резкость наводится с помощью макровинта, который опускают вниз или поднимают вверх.

4. При изучении препарата с большим увеличением сухой системы (объектив 40х) необходимо сначала исследовать препарат при малом увеличении (объектив 8х) и выбранный участок поставить точно в центре поля зрения, затем повернуть револьвер и подвести объектив 40х.

5. Иммерсионный объектив применяют при микроскопировании бактерий, в основном фиксированных и окрашенных. Для этого при малом увеличении (объектив 8х) находят участок лучше окрашенный, с равномерным распределением микробных клеток, затем на выбранный участок подводят иммерсионный объектив и непосредственно под объектив наносят небольшую каплю иммерсионного масла (по стеклу не размывать!). В иммерсионное масло объектив погружается с помощью макрометрического винта. За движением объектива наблюдают с боку, чтобы объектив тубуса не коснулся предметного стекла и не повредился. После этого, вращая макрометрический винт на себя, медленно поднимают тубус микроскопа до появления в поле зрения изучаемого объекта.

В дальнейшем фокусировку производят микрометрическим винтом, вращая его небольшими колебательными движениями. Это дает возможность получить изображение в фокусе и исследовать объект в глубину.

После работы с иммерсионным объективом кедровое масло должно быть удалено с объектива сначала фильтровальной бумагой и окончательной сухой салфеткой.

## Правила пользования и ухода за микроскопом

1. При переносе микроскопа его следует брать за штатив (тубусодержатель) и держать прямо перед собой, не опуская вниз.

2. Установленный на столе вначале работы микроскоп не следует сдвигать с места.

3. Микроскоп следует оберегать от пыли, его хранят или в футляре или под-стеклянным колпаком.

4. Нельзя оставлять микроскоп на солнце или около зажженной горелки: может расплавиться канадский бальзам, которым склеены линзы в объективах.

5. Окончив просмотр препарата, сначала поднимают тубус, а затем снимают со столика препарат.

6. По окончании работы сначала поднимают тубус и, поставив объектив в удобное положение, осторожно протирают объектив. Особое внимание обращают на иммерсионный объектив. Применяют только сухую, чистую, мягкую, много раз стиранную хлопчатобумажную ткань или специальную фланель.

7. Если масло не вытерто и оно высохло, его удаляют указанной тканью, слегка смоченной очищенным бензином или раствором спирта. Нельзя применять ксилол, т.к. он растворяет канадский бальзам.

8. При смене окуляров необходимо следить за тем, чтобы в тубус не попадали пылинки.

9. Необходимо особенно бережно относиться:

– к микровинту – не делать полных оборотов.

– к иммерсионному объективу, т. к. из-за короткого расстояния его фронтальной линзы легко раздавить предметное стекло.

### **Техника работы с микробиологическими инструментами и лабораторной посудой**

*Спиртовку* зажигать только с помощью спички. Зажигать спиртовку от другой спиртовки, передавать зажженную спиртовку со стола на стол категорически запрещается. Перед тем как зажечь спиртовку, необходимо снять колпачок и подвигать фитиль, чтобы удалить скопившиеся пары спирта в спиртовке. После работы спиртовку погасить, плотно завинтив колпачком горловину.

*Бактериологическую петлю* используют для посева микроорганизмов на питательные среды, для приготовления мазков-препаратов. При взятии культур с жидкой питательной среды лучше пользоваться стерильной пипеткой. Петлю готовят из платины или нихрома, т.е. быстро остывающих материалов. Петлю фламбируют (обжигают в пламени спиртовки) до и после ее использования. Петлю берут в правую руку как карандаш, прокалывают сначала вертикально, чтобы равномерно раскалилась на всем протяжении, затем горизонтально до покраснения. Пет-

лю фламбируют в верхней части пламени спиртовки, где наиболее высокая температура (от 600 до 1500°C). Прокаливают 5–7 секунд. Особенно тщательно фламбируют место крепления самой петли в петледержателе. Если в петле после работы осталось заметное на глаз содержание культуры микроорганизма, ее фламбирование нужно начинать с петледержателя, т.е. сначала горизонтально, чтобы культура в петле слегка подсохла, тогда при прокаливании петли вертикально не будет наблюдаться разбрызгивания микробной суспензии и загрязнения воздуха. После работы петлю ставят в стакан петледержателем вниз.

*Работа с пробиркой.* Микроорганизмы выращивают на питательных средах, разлитых в пробирки, чашки Петри или специальные матрасы. Для того чтобы взять микроорганизмы с твердой или жидкой питательной среды в пробирке, берут пробирку в левую руку, положив ее между большим и указательным пальцем отверстием вверх, подносят к пламени спиртовки. Большим и указательным пальцем правой руки держат прокаленную петлю, мизинцем правой руки открывают над пламенем спиртовки пробку пробирки и прижимают ее к ладони. Вводят петлю внутрь пробирки и охлаждают ее у внутренней поверхности стенки пробирки, иначе горячая петля повредит клетки микроорганизмов. Можно остужать петлю, прикоснувшись к питательной среде в пробирке. Затем петлей прикасаются к штриху, по которому растут микроорганизмы на питательной среде, и берут в петлю культуру объемом с маковое зернышко. Петлю вынимают, не касаясь стенок пробирки (взятые микроорганизмы можно использовать для приготовления мазка – препарата или для посева в другую пробирку). Край пробирки обжигают в пламени спиртовки и закрывают ее над пламенем спиртовки. При посеве микроорганизмов в другую пробирку с твердой стерильной питательной средой также открывают в пламени спиртовки и легким движением петли с культурой, не повреждая поверхности твердой среды, делают посев зигзагообразный или прямой линией. При посеве в жидкую среду с культурой петлю погружают в среду и слегка встряхивают. Пробирку с вновь посеянными микроорганизмами закрывают в пламени спиртовки, подписывают и ставят в термостат для выращивания.

Категорически запрещается при взятии микроорганизмов из пробирки или при их посеве, т. е. во время любой манипуляции с микроорганизмами, класть пробку, петлю, открытую пробирку на рабочий стол.

*Работа с чашкой Петри.* Если культура микроорганизмов выращена в чашке Петри с твердой питательной средой, чашку ставят на стол, рядом с пламенем спиртовки, левой рукой слегка приподнимают крышку так, чтобы в образовавшееся отверстие свободно проходила петля. Легким прикосновением к поверхности среды остужают обожженную

петлю и берут со штриха или из колонии культуру объемом с маковое зернышко. Чашку закрывают, а микроорганизмы используют либо для приготовления мазка, либо для посева на питательную среду в другой чашке или пробирке. При распределении суспензии микроорганизмов на поверхность твердой питательной среды в чашке Петри получают чистые культуры микроорганизмов, т. е. изолированные колонии. Более стерильные (чистые) посевы получаются, если чашку Петри держать на ладони левой руки на уровне пламени спиртовки, слегка приоткрывая крышку большим пальцем и мизинцем левой руки. Посев легкими круговыми движениями проводится шпателем (стеклянной палочкой) путем распределения суспензии микроорганизмов по всей поверхности среды в чашке.

**Материалы и методы:** микроскоп, иммерсионное масло, готовые окрашенные препараты микроорганизмов

#### Ход работы:

1. Изучить устройство микроскопа, назначение отдельных его частей.
2. Отработать приемы микроскопии в сухом и иммерсионных объективах.
3. Промикроскопировать готовые окрашенные препараты микроорганизмов разных форм (бактерии, бациллы, кокки, извитые, дрожжи и др.).
4. Записать ход работы при микроскопировании препаратов и зарисовать результаты микроскопирования

#### Задания

1. Изучить морфологию и структуру клеток эукариотов и прокариотов.
2. Рассчитать предел разрешающей способности микроскопа при работе с объективами: 90x, 40x, 20x, 8x.
3. С учетом величины рабочего расстояния объективов определить, каким винтом следует пользоваться при фокусировке объективов:
4. 90x, 40x, 20x, 8x
5. Определить увеличение микроскопа при использовании:  
окуляра 10x, объектива 8x  
окуляра 7x, объектива 40x  
окуляра 10x, объектива 90x  
окуляра 15x, объектива 90x
6. Рассчитать числовую апертуру водного, глицеринового и масляного объективов при попадании света под углом 90°.
7. Каким должно быть положение конденсора и диафрагмы при использовании иммерсионного или суховоздушного объективов?

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 2

### Методы исследования микроорганизмов в живом состоянии

**Цель:** рассмотреть методы окраски микроорганизмов в живом состоянии для изучения их подвижности, спорообразования, формы.

#### Общие сведения

Для определения формы микроорганизмов, органов плодоношения и спорообразования (у микроскопических грибов), подвижности (у бактерий) микробы исследуют в живом состоянии. Метод изучения микробов в живом состоянии имеет ряд преимуществ:

- 1) позволяет определить подвижность бактерий;
- 2) быстрота приготовления препаратов;
- 3) микробы изучаются в неподвижном виде, т. к. высушивание, фиксирование и окрашивание приводят к частичному изменению микробных клеток;
4. легче изучается тонкая структура более крупных микробных клеток (дрожжей, микроскопических грибов, простейших).

Однако метод изучения микробов в живом состоянии имеет и ряд недостатков:

- 1) изучение бактерий дает лишь общее представление о морфологии, поскольку невозможно сосредоточить длительное внимание на подвижных клетках;
- 2) трудно исследовать неокрашенные микробы ввиду плохой преломляемости света;
- 3) живые микробы исследуют в препаратах, приготовленных по методу «раздавленной» и «висячей» капли, которые используют для препаратов крупных микроорганизмов (дрожжи, грибы)

#### Приготовление препарата методом «раздавленной» капли

**Материалы и оборудование:** микроскоп, бактериологическая петля, предметные стекла, покровные стекла, спиртовки, пипетки, капельницы с водой, фильтровальная бумага.

#### Ход работы:

Для приготовления препарата «раздавленная» капля на чистое предметное стекло нанести каплю водопроводной воды. В нее внести культуру микроскопических плесневых грибов, взятую бактериологической пеглей с поверхности плесневого хлеба, смешать с водой. Накрывать

каплю покровным стеклом, так чтобы под ним не образовались пузырьки воздуха. Стеклопалочкой прижать покровное стекло к предметному и удалить избыток воды фильтровальной бумагой. Рассмотреть препарат под микроскопом.

Для микроскопирования дрожжей в химическом стакане с дистиллированной водой растворить щепотку прессованных дрожжей, помешивая стеклопалочкой суспензию. Поместить суспензию в термостат или в водяную баню при температуре 30°C и выдержать 20 минут. На чистое предметное стекло нанести пипеткой каплю полученной дрожжевой суспензии и покровным стеклом накрыть смоченную поверхность, избыток воды убирают кусочком фильтровальной бумаги.

Препарат «раздавленной» капли рассматривают под микроскопом с большим увеличением сухой системы (объектив 40, окуляр 10 или 15, в затемненном поле зрения, т. е. при опущенном конденсоре и суженной диафрагме).

### **Приготовление препарата методом «висячей» капли**

**Материалы и оборудование:** микроскоп, бактериологическая петля, предметные стекла, покровные стекла, спиртовки, пипетки, капельницы с водой, фильтровальная бумага.

#### **Ход работы:**

Для того чтобы наблюдать за подвижностью бактерий продолжительное время (в течение нескольких часов или даже неделю) применяют метод «висячей» капли. При этом пользуются предметным стеклом с отшлифованным углублением (лункой).

Препарат изготавливают из бульонной культуры или водной взвеси микробов. При этом суспензия микроорганизмов не должна быть густой. Обезжиренные предметное стекло с лункой и покровное стекло фламбируют в пламени спиртовки. Вокруг лунки по краям наносят тонкий слой вазелина.

На чистое покровное стекло нанести препаративной иглой негустую суспензию микроорганизмов, выращенных в физиологическом растворе (0,5 % раствор NaCl). Покровное стекло переворачивают и помещают на стерильное предметное стекло с лункой посередине так, чтобы капля свободно свисала над лункой. Для герметичности края лунки смазывают вазелином.

Найдя край капли и уточнив фокус, можно рассматривать препарат через объективы 40х, 60х и окуляр 15.

Микроскопирование «висячей» капли необходимо проводить с плоским зеркалом и суженой диафрагмой. Сначала, с помощью малого увеличения (объектив 8x) находят край капли, затем каплю передвигают в центр поля зрения, устанавливают большое увеличение сухой системы (объектив 40x) и, регулируя микроскопический винт, находят наилучшее изображение.

### **Задания**

1. Подготовить препарат «висячая капля» из суточной культуры сенной палочки. Пронаблюдать подвижность бактерий и определить характер их жгутикования.
2. Результаты занести в тетрадь

### **Контрольные вопросы:**

1. Что изучает морфология микроорганизмов?
2. В чем отличие прокариотической клетки от эукариотической?
3. Какое строение имеет дрожжевая клетка?

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 3

### Приготовление фиксированных окрашенных препаратов.

**Цель работы:** приобретение навыков приготовления фиксированных окрашенных препаратов микроорганизмов.

#### Общие сведения

Изучение морфологии микробов в фиксированном и окрашенном состоянии является наиболее распространенным методом в микробиологии. При фиксации быстро прерываются жизненные процессы в микробной клетке и их структура сохраняется неизменной. Поэтому в фиксированных и окрашенных препаратах можно получить четкое представление о форме и деталях строения микробной клетки, в связи с чем этот метод нашел широкое применение в микробиологии.

Этот метод позволяет изучить морфологические особенности микробов. Он удобен в практической работе, т. к. дает возможность найти различия между микроорганизмами.

Приготовление и изучение фиксированного и окрашенного препарата включает:

- приготовление мазка;
- высушивание мазка;
- фиксацию;
- окраску;
- микроскопирование препарата.

#### Приготовление мазка

1. Обезжирить предметное стекло, натерев его с обеих сторон кусочком хозяйственного мыла и протерев затем сухой салфеткой, так как только на обезжиренном стекле суспензия микроорганизмов хорошо растекается. Чаще всего обезжиривание предметных стекол проводят абсолютным спиртом или в смеси равных объемов спирта и эфира. Кладут стекло перед собой на темную поверхность (на стол).

2. Обожженной петлей на середину стекла нанести 2–3 капли физиологического раствора или суспензию культуры с жидкой среды.

3. С косога агара или с другого субстрата профламбированной бактериологической петлей взять культуру объемом с маковое зернышко и внести в каплю физиологического раствора. Взятие культуры из пробирки производят над пламенем спиртовки.

4. Размазать культуру тонким слоем по стеклу овалом не более 2 см<sup>2</sup>. Обжечь петлю и поставить в стакан. Обвести место мазка восковым карандашом, снизу стекла.

5. Мазок высушить на воздухе.

6. Зафиксировать сухой мазок. Существуют 2 метода фиксации: термический и химический (спиртом, парами осмиевой кислоты и др.). Самым распространенным является термический метод, когда мазок фиксируют над пламенем горелки в течение 3 сек. Стекло проводят над верхним пламенем спиртовки круговыми движениями 3–4 раза мазком вверх. Надежность фиксации проверяют, приложив стекло к тыльной стороне ладони – стекло должно быть теплым. В случае перегрева морфология бактерий исказится, так как произойдет свертывание белка, а в случае недогрева мазок смоеется со стекла при дальнейших манипуляциях. Фиксация необходима, чтобы убить микроорганизмы и сделать их безопасными для работы; закрепить микроорганизмы на стекле, чтобы они не смылись затем при окраске; мертвые клетки лучше воспринимают окраску, чем живые.

#### **Примечание:**

1. Предметные стекла нужно брать только за края, чтобы не оставлять на них отпечатков пальцев.

2. На одном предметном стекле можно приготовить 1–3 мазка, для этого вдоль стекла на его крае пишут восковым карандашом номера исследуемых мазков.

3. Для культур, выращенных на жидкой среде (молоко, бульон и т.д.), вода не требуется.

#### **Высушивание**

Препараты высушивают при комнатной температуре. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает равномерно и быстро. Для ускорения высыхания мазок осторожно подогревают над пламенем спиртовки, не допуская при этом его перегревания. При резком перегревании мазка может произойти слишком быстрое и глубокое свертывание белков в протоплазме микробов и это приведет к нарушению структуры клеток.

#### **Фиксация**

После высушивания приступают к фиксации препарата. Фиксацию производят с целью:

- убить микробы клетки;
- обеспечить лучшее прилипание мазка к препаратному стеклу.

Различают физический способ фиксации, предусматривающий воздействие высокой температуры на микробную клетку, и химический

способ, в основу которого положено применение химических препаратов, вызывающих свертывание белков протоплазмы.

В зависимости от исследуемого объекта применяют различные способы фиксации. Наиболее простым и распространенным в микробиологической практике является фиксация жаром.

Края препарата зажимают между большим и указательным пальцами. Мазки обращены вверх. Затем три раза проводят их через горячую часть пламени на границе светлой и темной части. Если мазки хорошо зафиксированы, то стекло при легком соприкосновении с тыльной стороной руки слегка обжигает кожу. Следует иметь в виду, что при перегревании стекла структура микроорганизмов изменяется. В то же время, плохо зафиксированный мазок легко смазывается во время окраски. Сохранившиеся на стекле живые клетки слабо воспринимают окраску и остаются почти бесцветными.

Для изучения строения бактериальной клетки фиксацию нагреванием не применяют. В этих случаях ее фиксируют химическими веществами.

В фиксирующую жидкость погружают на определенное время мазок или препарат и затем высушивают. Для фиксации мазков применяют следующие химические вещества и соединения:

Таблица 1. Время фиксации для различных веществ

№	Фиксирующее вещество	Время фиксации (мин)
1.	Этиловый спирт	15–20
2.	Метиловый спирт	5
3.	Ацетон	5
4.	Жидкость Кифирова (смесь равных объемов этилового спирта и эфира)	20
5.	Спиртформол (формалина 5 мл, спирта 95)	5–10
6.	Жидкость Карнау (95 % этилового спирта 60 мл, хлороформа 30 мл, ледяной уксусной кислоты 10 мл)	15
7.	Пары осмиевой кислоты (1–2 % раствора)	1–2

### Способы окрашивания микробов

Способы окрашивания микроорганизмов делятся на простые и сложные, или дифференцированные.

**Простая окраска** в микробиологической практике применяется наиболее часто. Простой способ окраски позволяет быстро ознакомиться с общей морфологией микробов. Для окраски клеток микроорганизмов наиболее пригодными являются анилиновые краски (основные и

нейтральные). При этом используется один вид какой-либо краски: метиленовая синяя (2–3 мин) или спиртоводный раствор фуксина (1–2 мин).

При простом методе окраски приготовленный и зафиксированный мазок-препарат размещают над ванночкой на стеклянном мостике, мазком вверх. Из капельницы на мазок наносят одну анилиновую краску (синьку Леффлера или фуксин) и оставляют ее на препарате 2–4 мин. Краситель можно налить и не прямо на мазок, а на кусочек фильтровальной бумаги, размещенной на мазке. Окраска получается чище. Через 2–4 мин смывают краску с препарата тонкой струей воды и высушивают препарат между листами фильтровальной бумаги. Затем мазок микроскопируют с применением иммерсии. При простых методах окраски можно увидеть форму и расположение микроорганизмов, их относительные размеры, наличие капсул.

*Капсула* – это слизистый слой, окружающий клетки отдельных бактерий. Она является продуктом жизнедеятельности клетки и состоит из различных полисахаридов или полипептидов. Капсула служит средством защиты или запасным питательным материалом клетки.

Наиболее распространена окраска капсул по методу Михина. На фиксированный препарат наносят метиленовую синь и красят ею в течение 3 мин при подогревании. Краску сливают, промывают препарат водой, просушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсией. Тело клеток окрашивается в синий цвет, капсула – почти бесцветна или бледно-розовая.

**Сложная окраска** применяется для детального изучения структуры клетки и при определении и дифференциации различных видов бактерий. Сложные способы окраски бактерий основаны на особенностях химико-физического строения микробной клетки и являются диагностическим методом в микробиологии. При сложных способах окраски на мазок воздействуют двумя видами красок, одна из которых является основной, а другая – дополнительной. Кроме того, применяются различные обесцвечивающие вещества: спирт, кислоты и т. п.

Сложных способов окраски много: окраска по методу Грама, окраска спор у бактерий и дрожжей, окраска клеточных включений, окраска капсул, окраска жгутиков и т. д. Впервые в 1884 г. датский физик Х. Грам предложил использовать сложный метод окраски, основанный на разной восприимчивости бактерий к одним и тем же красителям. Этот метод применяется широко и в настоящее время и называется методом окраски по Граму. Наиболее практическое значение имеет окраска по методу Грама.

### Окраска по методу Грама

Сущность окраски по Граму заключается в том, что краски трифенилметанового ряда (например, генцианвиолет, метилвиолет и др.) при соединении с йодом в присутствии магниевой соли рибонуклеиновой кислоты, мукополисахаридов и полифосфатнуклеотидов, которые содержатся в наружном слое цитоплазмы и клеточной стенке бактерий, образуют комплекс, плохо растворимый в спирте. К таким бактериям относятся грамположительные бактерии «Г+» (кокки, бациллы, актиномицеты, молочно-кислые бактерии, дрожжи). Клеточная стенка у этих бактерий состоит из многослойного муреина (мукополисахариды и полифосфатнуклеотиды), содержание которого колеблется от 50 до 95 %. После окраски их генцианвиолетом и обработки раствором Люголя (йод в водном растворе йодистого калия) они сохраняют фиолетовый цвет (цвет генцианвиолета), несмотря на дополнительную обработку спиртом.

У грамотрицательных «Г-» бактерий клеточная стенка состоит из однослойного муреина. Его содержание колеблется от 5 до 12 %. Генцианвиолет и йод не образуют с ним прочного соединения, и образующиеся комплексы легко вымываются из клетки спиртом. Такие бактерии обесцвечиваются спиртом и дополнительно докрашиваются фуксином, приобретая розовый цвет. К грамотрицательным бактериям относятся кишечная палочка, сальмонеллы, бруцеллы и др.

Таким образом, различное отношение бактерий к окраске по Граму зависит от количества муреина и его локализации в клеточной стенке.

Метод окраски по Граму является самым распространенным из сложных способов окраски. Отношение микробов к окраске по Граму является важным дифференциальным признаком, который, в сочетании с другими позволяет отличить один вид микроорганизмов от другого.

В зависимости от отношения к окраске по методу Грама все микроорганизмы делятся на две группы:

1) грамположительные бактерии, окрашенные в фиолетовый цвет (стафилококки, стрептококки, микрококки, сарцины, многие палочковидные бактерии и т. д.);

2) грамположительные бактерии, окрашенные в красный цвет (кишечная палочка, уксуснокислые бактерии, гонококки, менингококки и т. д.).

Различное отношение микроорганизмов к основной краске – генцианвиолету, объясняется разницей в физико-химическом составе протоплазмы микробных клеток.

У грамположительных бактерий генцианвиолет и йод образуют прочное соединение с протоплазмой магниевой соли рибонуклеиновой кислоты, которое при воздействии на них спиртом не разрушается и поэтому они не обесцвечиваются и в дальнейшем не окрашиваются фуксином Пфейффера.

Грамотрицательные бактерии образуют с генцианвиолетом и йодом непрочное, легко разрушающееся под действием спирта, соединение, в результате чего они обесцвечиваются и при дополнительном окрашивании фуксином Пфейффера приобретают красный цвет.

Отношение микробов к окраске по Граму является одним из важных дифференциальных признаков и применяется при классификации бактерий. В характеристике бактерий обязательно указываются их грамположительные и грамотрицательные свойства.

Окраску по Граму используют также с целью распознавания диапазона действия антибиотиков и других лечебных препаратов. Известно, что пенициллин действует главным образом на грамположительные бактерии, тогда как антибактериальное действие стрептомицина, биомицина распространяется на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Окраска по Граму значительно облегчает предварительное выявление этиологии пищевого отравления, ориентировочное определение загрязнения пищевых продуктов посторонними микробами (табл. 2).

**Таблица 2.** Окраска фиксированного мазка-препарата по Граму

Фаза	Краски, реактивы	Время действия	Процесс
1	Генцианвиолет (смывают водой)	2 мин	Окрашиваются все бактерии (грамположительные и грамотрицательные)
2	Раствор Люголя (стряхивают, можно промыть водой)	2 мин	Образуется комплекс: нерастворимый у грамположительных и труднорастворимый у грамотрицательных
3	Спирт 96°C (смывают водой)	30 с	Обесцвечиваются грамотрицательные бактерии
4	Фуксин (смывают водой)	1 мин	Окрашиваются грамотрицательные бактерии

**Материалы и оборудование:** микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, фильтровальная бумага, капельница с водой, капельницы с растворами красителей, иммерсионное масло, стерильные пипетки на 1 мл, спиртовки.

#### Ход работы:

1. На хорошо обезжиренное предметное стекло нанести тонкий мазок исследуемого материала (*Bacillus mesentericus*, *Lactococcus lactis*).

2. Мазок высушить на воздухе, зафиксировать над пламенем спиртовки и окрасить в течение 1 минуты феноловым раствором генциана фиолетового (или кристаллического фиолетового), держа стекло в несколько наклонном положении.

3. Слить краситель и, не промывая препарат водой, нанести на него раствор Люголя на 1 минуту (до полного почернения мазка). Стекло и в этом случае держать в наклонном положении. Слить раствор Люголя и, не промывая водой, обработать, непрерывно покачивая, 96 % спиртом в течение 15–20 секунд. Время воздействия спирта очень существенно, так как при превышении указанного срока обесцвечиваются и грамположительные клетки, при недостаточном сроке обработки препарат оказывается перекрашенным.

4. Промыть водой препарат и окрасить фуксином Пфейфера в течение 1 минуты. Слить избыток краски и промыть водой.

5. Высушить препарат фильтровальной бумагой и исследовать с иммерсионной системой. После этой обработки грамположительные микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные приобретают розовую окраску.

6. Рассмотреть под микроскопом и зарисовать в тетради форму и сочетание микробных клеток. Отметить грамположительные и грамотрицательные бактерии. Написать отчет о проделанной работе.

*Примечание:*

1. На обесцвечивание препарата следует обратить особое внимание, т. к. при недостаточной обработке спирта все микробы сохраняют окраску, при чрезмерном – все обесцвечивается. Контрольные мазки позволяют установить ошибку.

2. Чтобы получить правильную окраску, рекомендуется употреблять для окраски по Граму суточные культуры микробов, т. к. старые культуры дают неверные результаты.

**Контрольные вопросы:**

- 1 Правила приготовления мазка-препарата.
- 2 Простые методы окраски.
- 3 Сложные методы окраски.
- 4 Сущность окраски по Граму.
- 5 Чем отличается строение и состав клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий?
- 6 Какие свойства бактерий связывают с их принадлежностью к группам грамотрицательных и грамположительных?

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 4

### Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов

**Цель работы:** приобретение навыков приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов.

#### Общие сведения

Для выращивания (культивирования) микроорганизмов в лабораторных и производственных условиях с целью изучения физиологических и биохимических свойств, анализа микрофлоры используются специальные питательные среды.

В связи с особенностями питания микробов, питательные среды отличаются большим разнообразием. Они должны содержать необходимые вещества, из которых микробы получают материал для пластических и энергетических функций клетки.

Обязательными химическими элементами любых питательных сред являются органогены (С, Н<sub>2</sub>, О<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) Р, К, Mg, Fe, Mn, Ca (зольные элементы). Кроме того, они должны содержать микроэлементы (Co, Ni, Zn). Перечисленные элементы должны находиться в форме легко усвояемых микроорганизмами соединениях: углерод в форме глюкозы, сахара, спиртов, органических кислот. Источниками азота служат белковые вещества, пептоны, аминокислоты, соли аммония, нитраты. Остальные элементы вводятся в виде солей.

Для некоторых микроорганизмов необходимы, так называемые, ростовые вещества (или факторы роста) – это органические вещества, которые бактерии сами не синтезируют и необходимые в малых количествах. К ним относятся витамины, дрожжевые экстракты, растворы аминокислот, пуриновых, пиримидиновых оснований. Большое значение имеет количество Н<sub>2</sub>О, так как вода является растворителем питательных веществ. Ее должно быть не менее 60 %.

Питательные среды должны быть сбалансированными по составу, по концентрации растворенных веществ, иметь оптимальную влажность, вязкость, реакцию среды, окислительно-восстановительный потенциал.

По составу питательные среды делятся на естественные (натуральные) и искусственные (синтетические).

Натуральные среды состоят из продуктов животного и растительного происхождения, имеют сложный и непостоянный состав. Например, мясопептонный бульон (МПА), мясопептонный агар (МПА), дрожжевая вода и др. Натуральные среды используют для выращивания

микробов, накопления биомассы, хранения чистых культур, диагностических целей, но они малопригодны для изучения физиологии.

**Синтетические среды** состоят из определенных органических, химических и неорганических соединений, в точно указанных концентрациях (аминокислоты, сахара, витамины, минеральные соли). Они бывают сложными (для выращивания молочнокислых бактерий) и простыми (для автотропных микроорганизмов). Например, среда Чапека – для выращивания грибов, а среда Ридера – для дрожжей и т.д.

По назначению питательные среды делятся на универсальные, элективные и дифференциально-диагностические.

**Универсальные** (основные или стандартные) – это среды, благоприятные для выращивания многих видов микроорганизмов. Например, МБП, МПА, неохмеленное пивное сусло и др.

**Элективные** (избирательные) – это среды для развития только определенных видов микроорганизмов. Их применяют для выделения микробов из природных мест обитания и для получения накопительных культур.

**Дифференциально-диагностические** (индикаторные). Их используют для дифференциации видов микроорганизмов и идентификации чистых культур (разделения).

По концентрации среды бывают жидкими, твердыми и сыпучими.

**Жидкие среды** используют для накопления биомассы, продуктов обмена, для поддержания клетки в активном состоянии, хранения и изучения биохимических свойств микроорганизмов.

**Твердые** (плотные) среды используют для анализа микрофлоры различных объектов, выделения чистых культур, получения изолированных колоний, изучения культуральных свойств, количественного учета клеток, хранения чистых культур в музеях, пересылки их на заводы и т.д.

**Сыпучие** среды используют для приготовления маточного материала, для хранения музейных культур. Например, отруби, песок, пшено, почва и т.д.

### Уплотнение питательных сред

Для уплотнения питательных сред применяют агар-агар, желатин, кремнекислый гель.

**Агар-агар** – это сложный полисахарид, получаемый из морских водорослей путем экстракции при кипячении. Он бывает в виде порошка, пластинок или стебельков. В воде агар-агар набухает, размягчается и образует гель, температура плавления которого 100°C, а застывания – 40°C. Для уплотнения сред его добавляют в количестве 1,5–3,0%, если же среды жидкие, то 0,15–0,7 %.

**Желатин** – это белок, получаемый путем вываривания костей, хрящей и сухожилий животных. Он представляет собой пластины светлорычичевого цвета, без запаха и вкуса с температурой плавления 22–26,5°C. Среды с желатином применяют при получении гигантских колоний, при идентификации дрожжей.

**Кремнекислый гель** применяется как твердая основа для синтетических сред. Это смесь равных объемов HCl и жидкого стекла. После приготовления кремнекислый гель тщательно промывают проточной водой, а затем горячей дистиллированной водой для удаления хлоридов.

**Материалы и оборудование:** Йодный раствор, среда Эндо в г: пептон – 10, лактоза – 10,  $K_2HPO_4$  – 3,5,  $NaHSO_3$  – 2,5, агар – 150, вода дистиллированная – 1000, рН 7,4. колбы для приготовления сред, стеклянные палочки, набор минеральных солей, глюкоза, пептон, желчь, водяная баня, весы, шпатель, термометр, фарфоровая чашка, пипетка, сахариметр, бумажные фильтры, агар-агар, полотно, вата.

#### **Ход работы:**

**Приготовление картофельной среды.** Нарезать в химический стакан на 150 мл ломтиками 20 г очищенного, промытого водой картофеля, залить 100 мл водопроводной воды, варить 30 минут. Отвар фильтровать через бумажный фильтр и добавить воду до первоначального объема. К полученной жидкости добавить 2 г агар-агара, кипятить до его растворения и установить нейтральную реакцию среды (рН 7). Среду стерилизуют 20 минут при 1 атм.

**Приготовление сусла.** Зерно ячменя замочить в холодной воде и прорастить при 35°C. После того, как ростки станут вдвое больше, чем длина зерна, зерно высушивают до воздушно-сухого состояния и получают солод. Для приготовления сусла солод крупно размалывают и 250 г его берут на 1 л воды. Для лучшего выделения фермента амилазы смесь подогревают при 57°C до прекращения окрашивания раствора при добавлении йодного раствора (йодная проба на содержание крахмала). Пробы на содержание крахмала проводят в фарфоровой чашке в капле жидкости.

Сусло процедить через полотно, полученный фильтрат нагреть до кипения и кипятить 5–10 минут, затем фильтровать через бумажный фильтр. Такое сусло содержит 10–20% сахара. Точное его содержание определяют по плотности раствора при помощи сахариметра. Сусло разбавить водой до концентрации сахара 6–8% и стерилизовать при 115°C и давлении 0,5 атм. 30 минут.

*Приготовление сусло-агара.* К приготовленному суслу добавить 2% агара, кипятить до расплавления агара, фильтровать через полотно и стерилизовать таким же способом, как сусло.

*Приготовление молочно-солевого агара.* Мерным цилиндром отмерить 100 мл 2% стерильного агара, содержащего 6,5% хлорида натрия. Добавить к нему 10 мл обезжиренного стерильного молока.

*Приготовление среды Кесслера.* Отмерить 1 л водопроводной воды, прибавить 10 г пептона и 50 мл желчи. Смесь прокипятить при помешивании в течение 20–30 минут на водяной бане. Затем профильтровать через слой ваты. В полученном фильтрате растворить 2,5 г глюкозы и довести объем до 1 л, рН среды довести до значения 7,4–7,6. Добавить 2 мл 1% водного раствора кристаллического фиолетового. Среду разлить в пробирки с поплавками и стерилизовать при давлении 0,1 атм. В течение 10 минут. Готовая среда должна иметь темно-фиолетовый цвет.

*Приготовление дрожжевых сред*

*Дрожжевой экстракт.* 100 г прессованных дрожжей развести в 100 мл воды, смесь кипятить 1 ч, трижды фильтровать через бумажный фильтр и стерилизовать 30 минут при 115°C.

*Дрожжевая вода.* 5 г сухих дрожжей размешать в 100 мл воды, кипятить 10 минут, фильтровать через бумажный фильтр и стерилизовать по 30 минут текучим паром ежедневно в течение 3 суток.

*Приготовление среды 'Чанека.* Взять навески 2 г глюкозы, 0,2 г  $\text{NaNO}_3$ , 0,1 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 г  $\text{MgSO}_4$ , 0,05 г  $\text{KCl}$ , 0,01 г  $\text{FeSO}_4$ , вода дистиллированная 100 мл.

*Приготовление среды Эндо.* Среду приготовить в химическом стакане на 100 мл по прописи указанной на этикетке. После охлаждения среды до 50°C разлить в чашки Петри.

После приготовления питательных сред произвести посев микроорганизмов на эти среды.

*Посев на плотные среды.* Самым частым методом посева культуры микроорганизмов является посев на чашку Петри с агаризованной средой. Посев культуры осуществляется одним из трех способов:

- посев чертой – проводят петлю по прямой линии по середине питательной среды,
- посев штрихом – проводят зигзагообразную линию, скользя петлей по поверхности среды от одного края чашки Петри к другому,
- сплошной посев – растирают материал непрерывными круговыми движениями по всей поверхности питательной среды.

Посев проводят непосредственно около зажженной горелки, в пламени которой стерилизуется петля. Быстро переносят петлю с взятым материалом в чашку Петри с питательной средой приоткрыв крышку.

Затем закрывают крышку чашки Петри, а петлю тщательно прокаливают на пламени и ставят в штатив. Записанную чашку Петри подписывают, указав название посевного материала и дату посева. После этого ставят чашку Петри в термостат крышкой вниз.

При посеве на плотные среды нужно следить, чтобы не поцарапать среду петлей.

Техника посева на жидкие среды в основном такая же. Отличительные особенности посева на жидкие среды: недопустимо, чтобы жидкость питательной среды выливалась при горизонтальном положении пробирки, нужно следить, чтобы жидкость не смачивала краев пробирок и ватных пробок, при посеве жидкого материала можно пользоваться петлей или стерильной пипеткой.

### Контрольные вопросы:

- 1 Что такое питательная среда и для чего она предназначена?
- 2 На какие группы делятся питательные среды?
- 3 На какие группы делятся микроорганизмы в зависимости от типа питания?
- 4 На какие виды питательные среды делятся по назначению?
- 5 Что такое селективные питательные среды?
- 6 Для чего предназначены дифференциально-диагностические и селективные среды?
- 7 Что применяют для уплотнения питательных сред?
- 8 Каким образом можно создать селективные условия для культивирования микроорганизмов?

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 5

### Методы стерилизации питательных сред

**Цель:** ознакомиться с методами стерилизации питательных сред посуды и для культивирования.

#### Методы стерилизации

Стерилизацией называется полное уничтожение вегетативных клеток бактерий и спор микроорганизмов в том или ином субстрате. Стерилизация означает обеспложивание. Термин «стерильность» имеет абсолютное значение: либо объект стерилен, либо нестерилен, середины быть не может.

Различают термическую и холодную стерилизацию.

*Термическая стерилизация* включает прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровую стерилизацию (горячим воздухом), стерилизацию насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробную стерилизацию (тиндализацию и кохирование), кипячение.

*Холодная стерилизация* включает фильтрование через бактериологические фильтры, обработку ультрафиолетовыми лучами, химическими соединениями, газами.

В каждом отдельном случае приходится избирать такой способ стерилизации, который, давая надежный результат в смысле уничтожения всех микроорганизмов и их спор, не изменял бы в то же время свойства стерилизуемого объекта, не нарушал бы химического состава питательных сред, свойств материала и т. д.

В микробиологической практике в основном применяют термические способы стерилизации, которые также выбирают в зависимости от состава питательных сред, посуды и инструментов.

*Автоклавирование* – стерилизация насыщенным паром под давлением. Проводится в автоклаве. Выбор режима автоклавирования определяется составом питательных сред. Микробиологи чаще всего стерилизуют при 0,5 и 1 атм. Легко разрушающиеся субстраты, как молоко и желатиновые среды, субстраты, содержащие сахара и витамины (пивное сусло, соки), обычно стерилизуют при 0,5 атм в течение 15–30 мин. Мясопептонные среды стерилизуют при 1 атм 20 мин. Агаризованные среды требуют для стерилизации в 2 раза больше времени, чем такой же объем воды. С трудом поддаются стерилизации в автоклаве различные порошки (тальки) и вязкие жидкости (глицерин, вазелиновое масло), так как они плохо передают тепло и медленно нагреваются. Их лучше стерилизовать в сухожарочных шкафах. Почву и сильно заспоренные суб-

страты стерилизуют в автоклаве при 1 атм либо раз 2 ч, либо 2 дня подряд по 1 ч, а иногда при 2 атм 2 ч.

Режим стерилизации зависит от рН среды. При кислой реакции среды наблюдается гидролиз агара и желатины. В результате после стерилизации эти среды не застывают (особенно с желатиной). Если среда щелочная, карамелизуются сахара, выпадают в осадок соли железа. Нейтральные среды с сахарами (особенно ксилозой) при автоклавировании подкисляются до рН 6,0. Чтобы избежать негативных изменений при автоклавировании, рекомендуется углеводы, фосфаты, соли железа автоклавировать отдельно от остальной среды при более мягком режиме и объединять в нужном соотношении после стерилизации. Режим стерилизации зависит также и от объема материала. Чем больше материал, тем продолжительнее стерилизация при одной и той же температуре.

*Стерилизация текучим паром*, дробная стерилизация применяется для питательных сред, содержащих белки, углеводы (молоко, картофель и др.), которые при автоклавировании изменяют состав. Ее проводят в автоклаве с незакрепленной крышкой или в специальном аппарате Коха – металлическом цилиндре, на дно которого наливают воду. Над водой ставят сетку и на нее помещают стерилизуемый материал. Сверху аппарат закрывают крышкой с отверстием. Через него пар свободно выходит наружу. Стерилизуют от 30 мин до 1 ч с момента закипания воды. Погибают только вегетативные формы, а споры сохраняются. Поэтому среду помещают на сутки в термостат с температурой 30°C для прорастивания спор. Через сутки стерилизацию текучим паром повторяют, снова прорастивают споры и на 3-и сутки еще раз стерилизуют. Дробная стерилизация текучим паром в течение 30–60 мин в течение 3 суток с обязательным прорастиванием спор в промежутках между прогреваниями среды называется *кохированием*. Разновидностью дробной стерилизации является *тиндализация*. В аппарате Коха или в водяных банях стерилизуют вещества, легко разрушающиеся при температуре свыше 60°C. Прогревание проводят при 56–58°C в течение 1 ч с 5–6-кратным повторением через каждые 24 ч. В промежутке между прогреванием среды выдерживают при температуре 25–37°C.

*Пастеризация* – это одномоментный прогрев при температуре 60–70°C в течение 30 мин или 75–80°C в течение 5–10 мин. Введена Пастером для уничтожения вегетативных клеток, преимущественно патогенных микробов. Споры формы микроорганизмов сохраняются. Применяют для частичного обеспложивания молока, пива, вин и других продуктов. В пастеризованных продуктах сохраняются витамины и вкусовые качества. Длительному хранению не подлежат.

Стерилизация фильтрованием через бактериальные фильтры. Эти фильтры имеют очень мелкие поры. Бактериальные фильтры изготовляют из разных материалов: на основе нитроцеллюлозы (мембранные фильтры), асбестовые фильтры (из асбеста с целлюлозой), фарфоровые фильтры, фильтры из инфузорной земли, фильтры из стекла.

Микробные клетки задерживаются на фильтре, а вытекающая после фильтрации жидкость оказывается стерильной. Клетки микробов на фильтре задерживаются главным образом механически, так как их диаметр больше диаметра пор фильтра, а также потому, что поры идут через фильтр извилисто и на разном протяжении имеют разную форму и размер. Фильтры, приготовленные из положительно заряженного материала, еще и притягивают бактерии к стенкам пор, поскольку большинство бактерий в водной суспензии несет на своей поверхности отрицательный заряд.

Наиболее распространенные методы стерилизации приведены в табл. 1.

Таблица 1. Методы стерилизации

Метод стерилизации	Фактор стерилизации	Стерилизуемый объект
<i>Физические</i>		
Фламирование	Температура от 600 до 1500°C, приводящая к обугливанию микробов	Бактериологическая петля, пинцет, скальпель, игла, края пробирок, поверхности пробок
<i>Физические</i>		
Кипячение в воде или с добавлением 2%-го раствора карбоната натрия	Температура 100°C в течение нескольких часов, с содой – 15–30 мин	Хирургические инструменты, резиновые груши, шприцы, трубки
Сухим жаром в сушильном шкафу (печи Пастера)	Температура 160–170°C в течение 1 ч или 150°C в течение 2 ч	Стеклопосуда (пробирки, колбы, чашки Петри), вата
<i>Дробная стерилизация текущим паром</i>		
Кохирование (трехкратное повторение нагревания через каждые 24 ч)	Температура 100°C в течение 30–60 мин с последующим проращиванием спор	Питательные среды Гисса с сахарами, молоко, желатина
Тиндализация (5–6-кратное повторение нагревания через каждые 24 ч)	Температура 52–58°C в течение 60 мин с последующим проращиванием спор	Витамины, лекарственные препараты

Метод стерилизации	Фактор стерилизации	Стерилизуемый объект
<i>Химические</i>		
Фенол (3–5%-й раствор карболовой кислоты)	Поврежденные белки цитоплазм обладают максимальной поверхностной активностью	Предметные стекла с мазками микробов, посуда после культивирования микробов
Формалин (40%-й раствор формальдегида)	Денатурация белков микроорганизмов	Почва теплиц и парников
Хлорная известь (3–5%-й раствор)	Действие активного хлора	Почва теплиц и парников
<i>Механические</i>		
Фильтрация через бактериальные фильтры	Величина пор	Сыворотка крови, лекарственные препараты, объекты, пораженные вирусами

*Подготовка сред к стерилизации.* В процессе стерилизации теряется 3–5 % жидкости в результате испарения, поэтому в приготовляемые среды необходимо добавлять сверх объема 5 % дистиллированной воды. Среды стерилизуют в пробирках, колбах, заполняя их не более чем наполовину, чтобы предотвратить смачивание пробок. Пробки сосудов, которые будут стерилизоваться в автоклаве, нельзя обертывать фольгой, целлофаном, не пропускающими пар в сосуд, среда не нагреется до нужной температуры и не простерилизуется. Стекланные, резиновые, корковые пробки заворачивают в двойной слой оберточной бумаги и стерилизуют отдельно. Замену ими ватных пробок проводят над пламенем спиртовки.

*Мытье новой лабораторной посуды.* Новую посуду, которая не была в употреблении, моют мыльной теплой водой. Воду наливают в таз и растворяют в ней хозяйственное мыло или стиральный порошок до образования небольшого количества пены. В эту воду погружают посуду, ставят на слабый огонь и доводят до кипения. После закипания посуду вынимают, охлаждают и ополаскивают чистой водой. Чтобы нейтрализовать избыток щелочи, посуду погружают в теплый 1–2 %-й раствор соляной кислоты и кипятят 10 мин, ополаскивают водопроводной водой, а затем дистиллированной.

*Мытье посуды, бывшей в употреблении.* Посуду с посевами микроорганизмов перед мытьем заливают теплой водой и кипятят на медленном огне 40 мин, чтобы убить микроорганизмы. Затем посуду вынимают, а жидкость выливают в канализацию. Не очень загрязненную посуду затем моют горячей водой с мылом и тщательно прополаскивают сначала проточной водопроводной водой, затем дистиллированной. Более грязную посуду со следами агара, желатина, молока или другой питательной среды заливают на сутки 2–5 %-м раствором едкого натрия или калия. После этого прополаскивают и моют ершом и щеткой, прополаскивают повторно проточной водой, затем дистиллированной.

Если посуда сильно загрязнена, со следами жира, ее обрабатывают хромовой смесью. Она является сильным окислителем и хорошо разрушает остатки органических веществ. Хромовой смесью, подогретой до 45–50°C, заливают посуду на 30–40 мин. Посуду после обработки хромовой смесью тщательно промывают проточной, затем дистиллированной водой.

*Мытье градуированных пипеток.* Каждую пипетку внутри хорошо прочищают маленьким ершиком с длинной ручкой или тонкой упругой проволокой, на конец которой плотно накручивают кусок ваты или марли, и опускают в раствор мыльной воды, питьевой соды или стирального порошка. Закупорившийся канал пипетки прочищают иглой. Пипетки кладут в таз, заливают мыльным раствором и ставят на слабый огонь. Кипятят на слабом огне 20–30 мин, вынимают, ополаскивают проточной водой, потом дистиллированной.

*Мытье предметных и покровных стекол.* Стекла должны быть абсолютно чистыми и хорошо обезжиренными, чтобы капля воды, которую наносят на их поверхность, хорошо растекалась, мыть стекла рекомендуется в резиновых перчатках. Бывшие в употреблении стекла на 2 часа опускают в хромовую смесь, а потом тщательно промывают сначала проточной, а затем дистиллированной водой. Можно промыть стекла кипячением в течение 40 мин в растворе соды или щелочи (едкого натрия или калия).

Чистые стекла раскладывают в один ряд на фильтровальную бумагу для высушивания. Хранят чистые стекла в чистой закрытой посуде в сухом виде или в смеси спирта с эфиром 1:1.

*Сушка и хранение чистой лабораторной посуды.* Вымытую посуду не вытирают, а дают воде стечь и размещают пробирки на специальной доске с кольшками, а чашки – перевернув вверх дном на чистом столе.

Сухую чистую посуду хранят в местах, надежно защищенных от пыли.

*Подготовка посуды к стерилизации.* Сосуды (колбы, пробирки), предназначенные для розлива питательных сред, закрывают ватными пробками, а горлышки сверху обвязывают бумажными колпачками. Пробки предохраняют среду от заражения микрофлорой, находящейся в окружающем воздухе. Они не должны быть слишком плотными, чтобы не затруднять снабжение культур воздухом. Для приготовления пробок кусок ваты, взятый вдоль волокна, слегка увлажняют, загибают внутрь оба края и скатывают валиком по диаметру колбы или пробирки. Чтобы придать пробке прочность, ее прокатывают между ладонью и чистым стеклом, лежащим на столе. Пробка для пробирки должна иметь длину 4 см. Она должна входить в колбу или пробирку на 1,5–2 см. Пробку обертывают кусочком марли в 1 слой и край марли снаружи над пробкой связывают нитками. Перед этим особенно тщательно закручивают между пальцами рук ту часть пробки, которая входит в пробирку или колбу. Качество пробки проверяют так: берут за широкую часть пробки, вставленную в пробирку, и легко трясут ее. Пробка под тяжестью пробирки не должна выниматься. Закрытые пробками пробирки завертывают в бумажные пакеты по 10–15 шт. и стерилизуют.

*Чистые чашки Петри* перед стерилизацией заворачивают в оберточную бумагу по 2–3 шт. Бумагу режут на квадраты, сторона которых приблизительно равна трем диаметрам чашки. Чашки Петри кладут на середину листа, загибают его с двух противоположных сторон сверху так, чтобы края налегали друг на друга. Оставшиеся два конца бумаги завертывают вниз.

В верхние концы пипеток вставляют ватные тампоны, так, чтобы кусочек ваты был достаточно плотным и хорошо держался наверху пипетки. Торчащие из пипеток волокна ваты сжигают в пламени горячей спиртовки. Тампон позволяет избежать попадания микроорганизмов в резиновые шланги или в рот при взятии субстрата для анализа. Пипетки заворачивают в длинные полоски бумаги шириной 4–5 см, длиной 50–70 см. Бумагу на пипетку наматывают по спирали, начиная с оттянутого конца и заканчивая у конца с ватным тампоном. Завернутые пипетки перед стерилизацией упаковывают в оберточную бумагу по 10–15 шт. вместе или укладывают в специальные металлические или картонные пеналы. На бумаге пишут объем завернутых пипеток. Во время работы пипетки из пакета вынимают за верхний конец, где находится тампон.

*Шпатели* – обязательно упаковываются по отдельности, а затем их, как и пипетки, оборачивают в общий сверток. Каждый шпатель упаковывается в тонкую бумагу, начиная с треугольного конца. Он кладется на прямоугольный лист, равный по длине двум, а по ширине – одной

длине шпателя, на середину, по диагонали. Завертывают косячком верхнюю, затем нижнюю часть шпателя и по диагонали. Подготовленную посуду стерилизуют сухим жаром.

**Материалы и оборудование:** Чашки Петри, пипетки, пробирки, шпатели, колбы, ватные пробки для пробирок и колб, бумага для обертывания чашек и пипеток, суровые нитки.

#### **Ход работы:**

1. Изучить состав естественных, искусственных и синтетических питательных сред, свойства агар-агара, желатины.

2. Научиться готовить к стерилизации посуду (чашки Петри, пробирки, пипетки, шпатели), завернув ее в бумагу.

3. Познакомится с устройствами, используемыми для стерилизации посуды, сред, воздуха и т.д.

4. Подготовить для стерилизации чашки Петри, пипетки, шпатели.

5. Подготовить для стерилизации эрленмейеровские колбы с питательной средой.

6. Подготовить для стерилизации пробирки с водой (9 мл) и пустые для питательных сред.

7. Подготовить для стерилизации предметные стекла.

## ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 6

### Получение уксусной кислоты

**Цель работы:** изучить технологию получения уксусной кислоты.

#### Общие сведения

Уксуснокислые бактерии превращают спирт в уксусную кислоту. Окисление спирта чаще всего осуществляют бактерии родов *Gluconobacter* (глюконобактер) и *Acetobacter* (ацетобактер). Уксуснокислые бактерии – строгие аэробы, имеют метаболизм дыхательного типа (окисление, полное или неполное).

#### Неполное окисление:

1.  $C_2H_5OH + \frac{1}{2} O_2 = CH_3COH + H_2O$
2.  $CH_3COH + 1/2O_2 = CH_3COOH + H_2O$

#### Полное окисление:

1.  $C_2H_5OH + \frac{1}{2} O_2 = CH_3COH + H_2O$
2.  $CH_3COH + 1/2O_2 = CH_3COOH + H_2O$
3.  $CH_3COOH + O_2 = CO_2 + H_2O$

Содержание уксусной кислоты при получении ее биотехнологическими способами 6–9 %.

Уксуснокислые бактерии можно обнаружить на фруктах и цветах, в пиве, вине, кефире, соке сахарного тростника. В сообществе с дрожжами и некоторыми другими бактериями уксуснокислые бактерии образуют смешанную культуру – «чайный гриб».

Уксуснокислые бактерии на поверхности подкисленной среды, содержащей спирт, образуют серовато-белую пленку. Ацетобактер растет на средах с повышенным содержанием этилового спирта (до 10 %), глюконобактер – на среде с повышенным содержанием сахаров.

Бактерии рода *Acetobacter* способные к полному окислению спирта до  $CO_2$  и  $H_2O$ , а бактерии рода *Gluconobacter* осуществляют неполное окисление (до уксусной кислоты).

Под микроскопом бактерии родов *Acetobacter* и *Gluconobacter* выглядят как цепочки из крупных палочек. Клетки этих бактерий грамотрицательны.

**Материалы и оборудование:** колбы стерильные объемом 0,5–1,0 л с ватно-марлевыми пробками; предметные и покровные стекла; микро-

скоп; пипетки на 10 мл, 1 мл; непастеризованное пиво или вино; 6 % уксусная кислота; 0,1 н NaOH; фенолфталеин; бюретка; колбы конические; мерные цилиндры.

### Ход работы:

1. *Сбор установки.* В колбу объемом 1 л (0,5 л) отмеряется 500 (250) мл непастеризованного пива или вина, к которому добавлено 10 или 20 % по объему 6 % уксусной кислоты. Колбу закрывают ватномарлевой пробкой и оставляют на несколько дней при температуре 20–25°C.

2. *Определение исходного содержания уксусной кислоты.*

Отмерить 10 мл подкисленного пива (вина). Добавить несколько капель фенолфталеина. Титровать 0,1 н раствором NaOH до появления розовой окраски. Записать количество израсходованной щелочи ( $n_1$ ).

3. *Морфология уксуснокислых бактерий.* Образовавшуюся на поверхности пленку уксуснокислых бактерий микроскопируют (препарат мазок, окраска простым красителем – см. лабораторную работу № 2). Препарат микроскопируют с иммерсией (см. лабораторную работу № 2). Увиденное зарисовать. Уксуснокислые бактерии видны в виде цепочек из крупных палочек.

4. *Определение концентрации накопившейся уксусной кислоты.* Титруем 10 мл пробы после культивирования. Определяем  $n_2$ .

Расчет количества уксусной кислоты в среде,  $N$ , г/л:

$$N = n - 0.006 \cdot 100,$$

где  $n = n_1 - n_2$  – количество раствора 0,1 н NaOH, пошедшего на титрование 10 мл пробы; 0,006 – коэффициент пересчета. Записать результат.

### Контрольные вопросы:

- 1 Какие микроорганизмы могут быть продуцентами уксусной кислоты?
- 2 При получении уксусной кислоты используется окисление или брожение?
- 3 Какое вещество является субстратом при получении уксусной кислоты?
- 4 Как определяли количество получившейся уксусной кислоты?
- 5 Какие методы можно использовать для выделения уксусной кислоты?

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 7

### Изучение морфологических и культуральных признаков микроскопических грибов и дрожжей. Приготовление препаратов «раздавленная капля»

*Цель работы:* Ознакомиться с морфологическими особенностями грибов и дрожжей, встречающихся при производстве пищевых продуктов. Освоить технику микроскопического исследования грибов и дрожжей в препаратах «раздавленная капля».

*Оборудование, материалы:* Микроскоп; препаровальные иглы и бактериологические петли; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага; спиртовка; лоток с рельсами для предметных стекол; культуры грибов родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*; чистая культура дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

### Морфология и культуральные признаки микроскопических грибов

Микроскопические грибы относятся к надцарству эукариот, царству грибов, отделу истинных грибов и являются представителями трех из четырех классов: фикомицетов, аскомицетов и дейтеромицетов. Представители царства грибов являются аэробными микроорганизмами и по типу питания относятся к хемоорганогетеротрофам. Большинство грибов – сапрофиты, но некоторые вызывают заболевания и являются паразитами.

Вегетативное тело грибов называется *мицелием*. Мицелий состоит из множества переплетающихся нитей-трубочек, называемых *гифами*. Диаметр гифов, колеблется от 5 до 50 мкм. В зависимости от строения мицелия грибы делятся на высшие и низшие. У высших грибов гифы разделены перегородками (септами) в центре которых имеется большая пора. В класс фикомицетов объединяются низшие грибы, представители классов аскомицетов и дейтеромицетов являются высшими грибами.

Грибы – это *циноцитные* микроорганизмы. Это значит, что они растут и при этом происходят деления ядер, но не происходит клеточных делений. Таким образом, вегетативное тело гриба представляет собой одну большую многоядерную клетку.

Все микроскопические грибы могут размножаться вегетативно кусочком мицелия.

При бесполом размножении у фикомицетов образуются *спорангиеносцы*, а у аскомицетов – *конидиеносцы*. Дейтеромицеты могут размножаться *многоклеточными конидиями*.

Фикомицеты и аскомицеты являются *совершенными грибами*. Это значит, что представители этих классов могут размножаться половым путем. Дейтеромицеты относятся к *несовершенным грибам*.

### Культуральные признаки микроскопических грибов

Колонии микроскопических грибов по размерам во много раз превосходят колонии одноклеточных организмов (бактерий, грибов) и нередко разрастаются по всей поверхности питательной среды в чашках Петри. Консистенция грибных колоний различная. Чаще образуются войлокообразные и кожистые колонии, реже крошковатые. Поверхность колоний может быть пушистой, как вата, бархатистой, мучнистой, паутинообразной, нитевидной, кожистой или гладкой. При росте на плотных и жидких средах часть гифов врастает в питательную среду, образуя *субстратный мицелий*, а другая часть гифов образует *воздушный мицелий* в виде пушистого налета, видимого невооруженным глазом. Мицелий может быть также бесцветным (белым, сероватым) или окрашенным (черным, бурым, зеленым, желтым и т.д.). Пигментирован только плодоносящий мицелий.

*Характеристика микроскопических грибов различных классов*

Морфологические особенности грибов различных классов представлены на рис. 1.

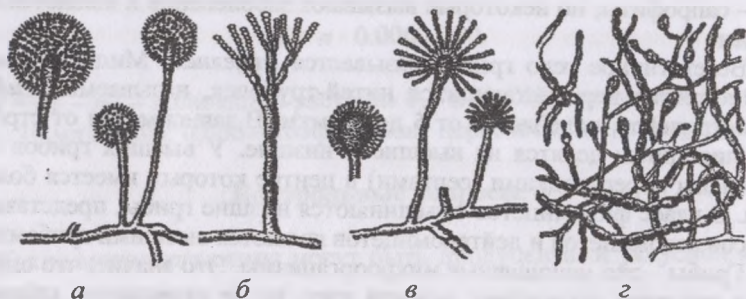


Рисунок 1 – Морфологические особенности грибов различных классов: а – *Mucor*; б – *Penicillium*; в – *Aspergillus*; з – *Alternaria*

Род *Mucor* относится к классу фикомицетов. Эти грибы имеют неseptированный мицелий. Они могут размножаться бесполом и половым путем с образованием спорангиеносцев (рис. 2). Снаружи спорангий покрыт тонкими шипами из кристаллов щавелевокислого кальция. При созревании спорангий разрывается, спорангиеспоры высвобождаются и разносятся воздушными потоками. На спорангиеносце после освобо-

дения спорангия от спор остается колонка, а в нижней ее части – воротник. Цвет мицелия мукоровых грибов вначале белый, затем серовато-оливковый, вид – войлокоподобный.

Мукоровые грибы растут на поверхности влажного зерна, солода, корнеплодов, на пищевых продуктах, на стенах сырых помещений в виде сероватого пушистого налета. *Mucor nigricans* является возбудителем кагатной гнили сахарной свеклы. Многие мукоровые грибы используются в промышленности для производства различных органических кислот и спирта (грибы видов *Mucor javanicus*, *Mucor racemosus*), ферментных препаратов, каротиноидов, стероидов.

Представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* относятся к классу аскомицетов, который объединяет высшие микроскопические совершенные грибы. При бесполом размножении с помощью спор эти грибы образуют конидиеносцы. Аспергиллы и пенициллы относятся к плодосумчатым грибам. Это значит, что при половом размножении у них на специальных плодовых телах образуются аски (сумки), в которых находятся 8 аскоспор.

К роду *Penicillium* относится около половины всех плесневых грибов. Они широко распространены в почве, в воздухе плохо проветриваемых помещений и вызывают порчу различных продуктов и материалов. Этот гриб имеет ветвящийся септированный мицелий (диаметр гифов – 2–3 мкм) и септированные конидиеносцы (напоминают кисточки), которые на конце разветвляются в виде отростков – стеригм. От них отходят конидии, состоящие из цепочек спор. В зависимости от вида конидии могут быть разного цвета (белые, зеленые и др.). Многие пенициллы используются в промышленности для получения различных ценных продуктов. Среди выделенных штаммов этого рода 25 % обладают антибиотической активностью, а такие виды как *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* используются как продуценты пенициллина. Некоторые виды пенициллов используются как продуценты ферментов и липидов. В производстве мягких сыров рокфор и камамбер используются благородные плесени *Penicillium roqueforti* и *Penicillium camamberti*.

Грибы рода *Aspergillus* насчитывают более 200 видов. Эти грибы имеют хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами. Конидиеносцы несептированы, верхние их концы грушевидно или шаровидно расширены в виде небольшой головки. На головке располагаются кеглеобразные стеригмы с цепочками конидий, которые напоминают струйки воды, выливающиеся из лейки. Отсюда возникло название «леечная плесень» (*aspergere* по латыни – поливать, опрыскивать). Конидии аспергиллов при созревании приобретают различную окраску, что наряду с другими признаками определяет их видовую принадлежность.

Так же как и пенициллы, представители рода *Aspergillus* широко распространены в природе и играют важную роль в минерализации органических веществ. Они вызывают плесневение многих пищевых продуктов. Эти грибы являются продуцентами многих ценных веществ и широко используются в промышленности. Так, *Aspergillus niger*, применяют в промышленности для производства лимонной кислоты; *Aspergillus terreus* – итаконовой кислоты *Aspergillus flavus* и *Aspergillus terricola* образуют наиболее активный комплекс протеолитических ферментов; *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus awamori* являются лучшими продуцентами амилолитических ферментов.

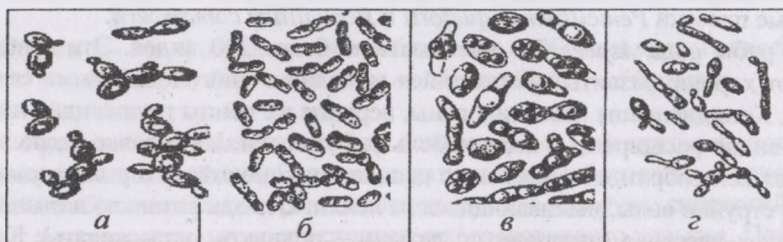
Грибы рода *Alternaria* относятся к классу несовершенных грибов – дейтеромицетов. Это высшие грибы. Они имеют септированный мицелий и короткие несептированные конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии грушевидной или лимоновидной формы. Гриб является возбудителем черной гнили – болезни корнеплодов и плодов, а также возбудителем порчи пищевых продуктов.

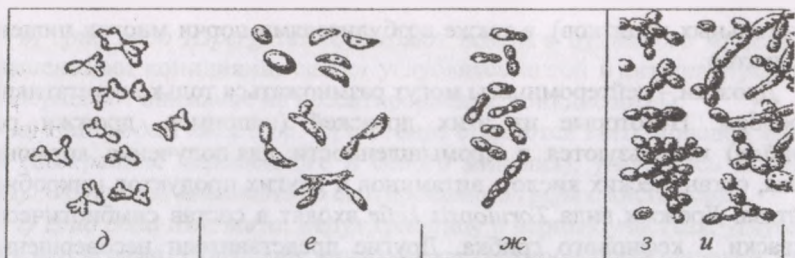
### Морфология дрожжей и их характеристика

*Дрожжи* – это высшие одноклеточные грибы. Большинство дрожжей относится к двум классам грибов – аскомицетам и дейтеромицетам.

Дрожжи по отношению к кислороду делятся на факультативные анаэробы (в аэробных условиях осуществляют дыхание и активно накапливают биомассу, а в анаэробных условиях вызывают спиртовое брожение) и аэробы.

Морфологически дрожжи разнообразны. Они отличаются друг от друга размерами и формой клеток. Размеры клеток дрожжей в зависимости от вида варьируют в следующих пределах; от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. Морфологическое разнообразие форм дрожжей изображено на рис. 2.





**Рисунок 2** – Формы дрожжевых клеток:

а – овальная яйцевидная; б – цилиндрическая; в – апикулятная; лимоновидная; г – стреловидная; д – треугольная; е – серповидная; ж – колбовидная; з, и – мицелиевидная

Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды, способа культивирования.

В зависимости от вида дрожжи вегетативно могут размножаться почкованием (так размножаются дрожжи овальной формы), бинарным делением (характерно для дрожжей цилиндрической или палочковидной формы) или почкующимся делением. Кроме вегетативного размножения, дрожжи – аскомицеты могут размножаться половым путем с образованием аскоспор.

Из дрожжей, относящихся к классу аскомицетов, большое значение имеют дрожжи-сахаромицеты рода *Saccharomyces*, которые широко используются в пищевой промышленности. Главным биохимическим признаком этих дрожжей является то, что они сбраживают сахара с образованием этилового спирта и диоксида углерода. Дрожжи, используемые в промышленности, называются *культурными дрожжами*. Так, в хлебопекарном производстве и в производстве спирта используются верховые дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи вида *Saccharomyces minor* нашли применение в производстве ржаного хлеба и кваса. В пивоварении используются низовые дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Дрожжи-сахаромицеты имеют овальную форму, вегетативно размножаются почкованием, в неблагоприятных условиях размножаются половым путем аскоспорами.

Некоторые спорогенные дрожжи являются *дикими дрожжами*. Эти дрожжи так же, как и культурные, способны осуществлять спиртовое брожение, но помимо спирта образуют большое количество побочных продуктов (таких как альдегиды, высшие спирты, эфиры и др.) и поэтому ухудшают органолептические показатели продукта. Эти дрожжи являются вредителями производства различных напитков (пива, вина, без-

алкогольных напитков), а также возбудителями порчи многих пищевых продуктов.

Дрожжи – дейтеромицеты могут размножаться только вегетативным способом. Некоторые из этих дрожжей (например, дрожжи рода *Candida*) используются в промышленности для получения кормового белка, органических кислот, витаминов и других продуктов микробного синтеза. Дрожжи вида *Torulopsis kefir* входят в состав симбиотической закваски – кефирного грибка. Другие представители несовершенных (аспорогенных) дрожжей являются дикими дрожжами и вызывают порчу многих пищевых продуктов. К дрожжам – вредителям производства относятся дрожжи родов *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycoderma*, *Trichosporon* и др. Среди аспорогенных дрожжей встречаются *ложные дрожжи*, которые образуют псевдомицелий и растут на жидких субстратах в виде пленок.

### Ход работы

На занятии студенты изучают морфологические признаки грибов и дрожжей, их культуральные свойства, знакомятся с представителями отдельных классов. Осваивают методику приготовления препаратов «раздавленная капля» и технику микроскопирования живых неокрашенных объектов.

#### Приготовление препаратов типа «раздавленная капля»

1. На предметное стекло трубочкой или пипеткой наносят большую каплю воды или этилового спирта;
2. Зажигают спиртовку, прокаливают препаративную иглу над пламенем горелки и отбирают небольшое количество мицелия из пробирки или чашки Петри, соблюдая правила асептики.
3. Мицелий аккуратно помещают в каплю, нанесенную на предметное стекло и с помощью двух игл расправляют его в воде;
4. Препарат накрывают покровным стеклом и слегка придавливают. Излишки воды удаляют с помощью фильтровальной бумаги.
5. Микроскопируют препарат «раздавленная капля» сначала с объективом х8, а затем х40 в затемненном поле зрения.

При отборе и микроскопии препаратов грибов учитывают следующие рекомендации:

а) *гриб рода Mucor*. Отбирают черновато-серый пушистый воздушный мицелий. При микроскопии обращают внимание на гифы с заполненными спорами спорангиями и колонки, которые образуются при освобождении спорангия;

б) *гриб рода Aspergillus*. Отбирают немного пушистого мицелия с окрашенными конидиями, слегка углубляясь иглой в питательную среду. Обращают внимание на несептированные конидиеносцы;

в) *гриб рода Penicillium*. При отборе стараются взять молодой мицелий (на границе окрашенного и белого мицелия), углубляясь иглой в среду. Обращают внимание на септированные гифы с кисточками.

г) *гриб рода Alternaria*. Берут грибницу в черных участках, углубляясь в нее иглами. Обращают внимание на септированный мицелий, слабо развитые конидиеносцы и крупные конидии, имеющие вид округлых или заостренных многоклеточных образований, напоминающих «гранаты-лимонки».

При исследовании дрожжей на предметное стекло наносят суспензию дрожжей, накрывают покровным стеклом, излишки воды удаляют фильтровальной бумагой. Микроскопируют препарат и объективом х8 и х40.

В ходе работы студенты кратко конспектируют теоретический материал. Зарисовывают микроскопические картины исследованных культур грибов и дрожжей с учетом морфологических особенностей каждого микроорганизма. Под каждым рисунком подписывают латинское название и увеличение препарата. Описывают культуральные свойства изучаемых грибов.

### Контрольные вопросы

- 1 Как готовятся препараты микроскопических грибов и дрожжей?
- 2 Охарактеризуйте морфологические и культуральные свойства микроскопических грибов.
- 3 Какие грибы используются в промышленности для получения органических кислот, ферментов, антибиотиков и других ценных продуктов?
- 4 Охарактеризуйте морфологические свойства дрожжей.
- 5 Что такое культурные дрожжи? В каких отраслях пищевой промышленности они используются?

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 8

### Водоросли

**Цель:** изучить по гербарным образцам разнообразие водорослей.

**Материалы и оборудование:** микроскопы световые, гербарные образцы различных представителей водорослей.

### Ход работы:

1. По гербарным образцам ознакомиться с разнообразием талломов багрянок, обратив внимание на их размеры, форму, окраску и др.

2. Ознакомиться с общим видом порфиры по гербарным образцам. Изучить и зарисовать разрез участка таллома водоросли с органами размножения.

3. Изучить и зарисовать строение таллома батрахоспермума при малом увеличении микроскопа и фрагмент таллома с ассимиляторами и цистокарпием при большом.

4. Рассмотреть и зарисовать строение клетки хламидомонады. Отметить лектиновую оболочку, две пульсирующие вакуоли вблизи переднего конца тела, красный глазок (стигму) рядом с вакуолью, чашевидный хроматфор, пиреноид, ядро, два равных жгутика. Чтобы рассмотреть последние, надо окрасить препарат 2%-ным раствором метиленовой сини или раствором Люголя. Для этого раствор по каплям наносят на предметное стекло с одного края покровного стекла, а с противоположного края оттягивают воду полоской фильтровальной бумаги.

5. Рассмотреть и зарисовать ценобии вольвокса, гониума, эвдорины и пандорины. Отметить у вольвокса вегетативные клетки, составляющие колонию, плазмодесмы, репродуктивные клетки (располагаются в задней части ценобия, более крупные, чем вегетативные клетки), оогонии и антеридии, дочерние особи. Обратит внимание на количество клеток и их расположение в каждом ценобии.

### Контрольные вопросы

- 1 Каковы особенности строения клетки и таллома красных водорослей?
- 2 Какими пигментами определяется окраска клетки багрянок и как она изменяется в связи с условиями местообитания?
- 3 Какие формы размножения известны у багрянок?
- 4 Охарактеризовать циклы развития у различных представителей красных водорослей.

- 5 Как и на основании чего намечается эволюция в пределах всего отдела Красные водоросли?
- 6 Каково значение красных водорослей в природе и народном хозяйстве?
- 7 Какие типы структуры таллома характерны для отдела Зеленые водоросли?
- 8 Назовите пигменты и продукты ассимиляции зеленых водорослей?
- 9 Охарактеризуйте строение клетки вольвоксовых, роль всех ее структурных компонентов.
- 10 Каково строение и размножение ценобиальных форм вольвоксовых?
- 11 Опишите строение и жизненный цикл вольвокса.
- 12 Каково происхождение вольвоксовых и каковы направления их эволюции?
- 13 Чем отличаются цианобактерии от фототрофных зеленых и пурпурных бактерий по строению тела, набору пигментов и типу фотосинтеза?
- 14 Чем отличается строение клетки синезеленых водорослей от строения клетки других организмов?
- 15 Какие формы организации таллома и размножения известны у цианей?
- 16 Какие пигменты и запасные продукты отмечены в клетках синезеленых водорослей?
- 17 В чем заключается уникальность фотосинтезирующего аппарата синезеленых водорослей?
- 18 Каково значение синезеленых водорослей в природе и народном хозяйстве?
- 19 Каковы особенности строения и образа жизни эвгленовых водорослей?
- 20 Каково значение некоторых представителей эвгленовых водорослей для характеристики степени загрязненности воды?
- 21 В каких случаях эвгленовые водоросли переходят на миксотрофный способ питания?

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 9

### Особенности строения простейших

**Цель:** изучить разнообразие представителей типа Саркомастигофоры, особенности и их строения и жизнедеятельности.

**Материалы и оборудование:** микроскоп, лупы, микропрепараты амебы, фораминифер, радиолярий, микропрепараты эвглены зеленой, трипаносомы, опалины лягушачьей.

Тип Саркомастигофоры – *Sarcomastigophora*

Подтип Амебоидные – *Sarcodina*

Класс Саркодовые – *Sarcodina*

Подкласс Корненожки – *Rhizopoda*

Отряд Амебы – *Amoebina* Вид Амеба протей – *Amoeba proteis*

**Задание 1.** На постоянном микропрепарате рассмотрите амебу, отметьте форму тела, основные органоиды, видимые в микроскоп. Зарисуйте общий вид амебы. Обозначьте общее расположение органоидов ее тела (псевдоподии, ядро, энто- и эктоплазму, сократительную и пищеварительную вакуоли).

**Задание 2.** На постоянном микропрепарате рассмотрите эвглenu зеленую, отметьте форму тела, передний и задний концы тела, расположение жгутиков. Зарисуйте общий вид эвглены зеленой. Обозначьте общее расположение органоидов ее тела (ядро, 12 сократительную вакуоль, хроматофоры, жгутик, стигму, пелликулу, экто и эндоплазму, парамилые зерна).

**Задание 3.** Изучите строение трипаносомы. Зарисуйте внешний вид трипаносомы. Обозначьте расположение органоидов ее тела (ядро, ундулирующая мембрана, кинетопласт, жгутик).

**Задание 4.** Изучите внешний вид опалины. Обратите внимание на форму тела, размеры, экто- и эндоплазму, многочисленные ядра, и расположение в эндоплазме, жгутики, локализация которых заметна по неровным рядам, вдоль продольной оси тела. Зарисуйте общий вид опалины лягушачьей, обозначьте ядра, экто- и эндоплазму, жгутики.

**Задание 5.** Заполните таблицу «Черты сходства и различия в биологии, физиологии, и экологии эвглены зеленой, трипаносомы и опалины лягушачьей».

Элементы сравнения	Эвглена зеленая	Трипаносома	Опалина лягушачья
Форма тела			
Размеры			
Наличие оргanelл движения			
Наличие ядер, их количество			
Способность к восприятию световых раздражений			
Способы поглощения воды			
Образ жизни			
Место обитания			

**Задание 6.** Составьте сравнительную таблицу основных признаков простейших.

Систематическое положение животного	Среда обитания	Скелет	Движение	Органеллы		Способ размножения
				Пищеварительные вакуоли	Сократительные вакуоли	

### Контрольные вопросы

- 1 Назовите компоненты клетки простейших.
- 2 Укажите систематическое положение Жгутиковых.
- 3 Назовите основные способы питания представителей типа Жгутиковые.
- 4 Дайте общую характеристику типа Жгутиковые.
- 5 Перечислите представителей типа Жгутиковых, являющихся паразитами человека и животных.
- 6 Почему эвглену зеленую изучает как зоология, так и ботаника? Объясните значение следующих терминов: стигма, хроматофоры, кинетосома, ундулирующая мембрана.
- 7 Назовите болезни, вызываемые амебами у человека и домашних животных.
- 8 Укажите, по каким деталям строения амебы можно отличить пресноводные виды от обитателей соленых водоемов.

- 9 Назовите органеллы питания амёб.
- 10 Назовите способ деления ядра у амёб.
- 11 Перечислите признаки, по которым можно установить видовую принадлежность амёб.
- 12 Охарактеризуйте процессы в цитоплазме, сопровождающие ее перемещение в теле амёб.

№	Вопрос	Ответ
9	Назовите органеллы питания амёб.	Вакуоли, лизосомы, митохондрии.
10	Назовите способ деления ядра у амёб.	Митоз.
11	Перечислите признаки, по которым можно установить видовую принадлежность амёб.	Форма, размеры, наличие жгутиков, способ передвижения, способ питания.
12	Охарактеризуйте процессы в цитоплазме, сопровождающие ее перемещение в теле амёб.	Амёба перемещается с помощью ложноножек, которые образуются из цитоплазмы. Этот процесс сопровождается сокращением и расширением цитоплазмы.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 10

### Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений

**Цель работы.** Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей на примере среды Мурасиге-Скуга

#### Общие сведения

Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы, витамины, углеводы, фитогормоны. Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина, определенные аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, повышающие доступность железа для клеток в широких пределах рН.

Углеводы выступают необходимым компонентом питательных сред при культивировании изолированных клеток и тканей, так как они не способны к автотрофному питанию. Обычно в качестве источника углеводов используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 20–40 г/л. Опухолевые ткани, в которых много активных гидролитических ферментов, могут расти на средах с растворенным крахмалом.

Регуляторы роста необходимы для дифференцировки клеток и для индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны входить ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление дедифференцированных клеток. В случае индукции стеблевого морфогенеза можно снизить содержание ауксинов в среде или исключить их из питательной среды. На средах без гормонов растут опухолевые и «привыкшие» к таким условиям ткани. Автономность по отношению к гормонам того и другого типа или к одному из них связана со способностью клеток синтезировать гормоны.

В качестве источников ауксинов в питательных средах обычно используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) – 1–10 мг/л, а также индолилуксусную кислоту (ИУК) – 1–30 мг/л, и нафтилуксусную кислоту (НУК) – 0,1–2 мг/л. ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д. Для индукции образования каллуса обычно применяют высокие концентрации ауксинов, а при последующих пересадках ткань может расти, если содержание ауксинов в среде уменьшено в несколько раз.

В качестве источника цитокининов в искусственных питательных смесях используют кинетин, 6-бензиламинопури́н (6-БАП), зеатин

(0,001–10 мг/л). Зеатин и БАП более активны в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза, чем кинетин. В состав некоторых питательных смесей входит аденин.

Отдельные питательные среды включают кроме ауксинов и цитокининов гибберелловую кислоту (ГК). Иногда к питательной среде добавляют растительные экстракты или соки. Наибольшей ростактивирующей способностью обладает кокосовое молоко – жидкий эндосперм кокосового ореха.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар-полисахарид, получаемый из морских водорослей. Наименьшее количество нежелательных примесей содержат бактериальный агар «Difco» и бактериальный агар отечественного производства, их можно применять без предварительной промывки. Обычно для получения твердой питательной смеси к среде добавляют 5–8 % агара.

Растворы макросолей, микросолей и витаминов удобно готовить концентрированными. Маточные растворы хранят в холодильнике, витамины при отрицательной температуре. В 10–20 раз более концентрированными, чем нужно, готовят растворы макросолей, в 100–1000 раз более концентрированными – растворы микросолей, в 1000 раз – растворы витаминов.

Для культивирования клеток, тканей и органов тех или иных растений используют питательные среды различного состава. Наиболее широко применяются среда Мурасиге-Скуга (табл. 1, 2), среда Уайта, среда Гамборга, или В-5.

**Материалы и оборудование:** Химреактивы (табл. 1). Колбы или стаканы химические на 1 л, банки с притертыми пробками для хранения маточных растворов на 1 л и 100 мл, баночки на 20–50 мл, мерные пипетки на 10 и 1 мл, весы технические, весы торзионные, электроплитка.

#### Ход работы:

Приготовить питательную среду Мурасиге и Скуга (табл. 1) для культивирования растительных органов и тканей.

Таблица 1 – Среда Мурасиге и Скуга, pH 5,6–5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{KNO}_3$	1900	$\text{Na}_2\text{-ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	Тиамин – HCl	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	370	Пиридоксин – HCl	0,5

Продолжение таблицы 1

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	Никотиновая кислота	0,5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	Мезо-инозит	100
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	Глицерин	2,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	ИУК	2,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	Кинетин	0,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	Сахароза	30.000
KI	0,83		

Прежде всего необходимо приготовить маточные растворы макро-, микросолей и витаминов. Для среды Мурасиге и Скуга обычно готовят маточные растворы следующего состава: 1)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  вливают последним без нагревания, что предотвращает выпадение осадка); 2) раствор  $\text{CaCl}_2$ ; 3) раствор хелата железа (раствор  $\text{FeSO}_4$  и ЭДТА- $\text{Na}_2$ , необходимый для образования хелата железа, следует нагреть до кипения); 4) раствор микроэлементов.

Полученные растворы сливают в склянки с притертой пробкой, снабжают этикеткой и хранят в холодильнике. Хелат железа хранят в темной склянке.

Концентрированные растворы витаминов (каждого в отдельности) хранят во флакончиках. Для приготовления растворов берут десятикратную по отношению к добавляемой дозе навеску витамина и растворяют в 10 мл воды. В 1 мл этого раствора содержится порция витамина, необходимая для приготовления 1 л раствора по прописи Мурасиге-Скуга.

Количество солей, необходимое для приготовления маточных растворов, а также количество маточного раствора, которое надо взять для приготовления питательной среды, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Состав маточных растворов по Мурасиге и Скугу

Макросоли, г/л маточного раствора	Компоненты питательной среды
$\text{KNO}_3$	38
$\text{CaCl}_2$ (безводный)	8,8
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	33
или $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13,8
$\text{MgSO}_4$ (безводный)	3,6
или $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,4
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,4

Примечание: на 1 л среды брать по 50мл маточного раствора макросолей

Микросоли, мг/100 мл маточного раствора	
$H_3PO_4$	620
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2230
$ZnSO_4$	860
KI	83
$Na_2MoCl_4 \cdot 2H_2O$	25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,5
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2,5
Примечание: на 1 л среды брать по 1 мл маточного раствора микросолей	
Fe-хелат, мг/100 мл маточного раствора	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	557
ЭДТА-Na <sub>2</sub> (трилон Б)	745
На 1 л среды брать по 5 мл маточного раствора	

Используя маточные растворы, надо приготовить питательные среды для культивирования органов и тканей растений. В химический стакан или колбу емкостью 1 л помещают навеску сахарозы 30 г, доливают до половины дистиллированную воду, нагревают, после растворения сахарозы добавляют необходимые количества маточных растворов макро-солей, микросолей, витаминов и доводят объем до 1 л дистиллированной водой.

Растворы фитогормонов готовят следующим образом.

**Ауксины** (2,4-Д, НУК, ИУК, индолил-масляная кислота – ИМК): 100 мг вещества растворяют в 0,5–2 мл спирта, подогревают, добавляют дистиллированную воду до 100 мл (концентрация 1 мг/мл).

**Цитокинины** (кинетин, зеатин, БАП): растворяют в небольшом объеме 0,5 н. HCl, подогревают, добавляют соответствующий объем дистиллированной воды.

**Абсцизовая кислота** (АБК): навеску растворяют в 70%-ном этаноле, доводя до нужного объема.

**Гиббереллиновая кислота** (ГК): навеску растворяют в воде.

При введении фитогормонов в среду перед автоклавированием следует обязательно довести pH среды до 5,5–5,6. Однако следует учитывать, что после автоклавирования изменяется первоначальный состав термолабильных компонентов среды. Так, тиамин распадается на пиримидин и тиазол, а кинетин и ИУК теряют часть своей активности. В связи с этим витамины и особенно термолабильные фитогормоны стерилизуют фильтрованием, пропуская через фильтр Зейца или «Миллипор» с

диаметром пор 0,4 мкм (НУК, ИУК, зеатин, БАП). В этом случае для регуляции pH среды используют стерильные растворы щелочи.

Агар-агар предварительно замачивают в воде для набухания. Затем его нагревают на электроплитке при помешивании до полного растворения. После этого раствор агара надо слить с раствором солей, витаминов и сахарозы и довести объем среды до 1 л. Колбы со средой закрывают ватной пробкой, бумагой или фольгой и стерилизуют в автоклаве.

Питательные среды разливают в пробирки (1/3 объема), которые закрывают ватными пробками или фольгой, стерилизуют в автоклаве.

### Контрольные вопросы:

1 Каков состав питательных сред для изолированных клеток и тканей?

2 Какие вещества используют в качестве ауксинов в питательных средах?

3 Что такое маточные растворы и как их готовят?

4 Сравните составы трех питательных сред. Найдите отличия. Сгруппируйте составные компоненты питательных сред (макроэлементы, микроэлементы, молекулы пластического обмена, биорегуляторы, ЭДТА). Свяжите состав питательных сред с молекулярными процессами в культивируемых клетках, тканях, органах.

5 Питательные среды готовят из «маточных» растворов, которые хранят при низкой температуре. В «маточных» растворах повышена концентрация макроэлементов в 10–20 раз, микроэлементов – в 100–1000 раз, витаминов – в 1000 раз. Предложите варианты «маточных» растворов солей макроэлементов, Fe-хелата ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), солей микроэлементов, витаминов, биорегуляторов для быстрого приготовления рабочих питательных сред для культивирования.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 11

### Получение каллусов из листьев табака

**Цель работы:** приобрести навыки работы по получению аллусной культуры табака.

Перед выполнением операций в ламинарном боксе необходимо подготовить его к работе. Для этого используют стерилизацию ультрафиолетом в течение 30 мин с последующим протиранием рабочих поверхностей 70–96% этанолом. Основное требование к проведению манипуляций – соблюдение условий стерильности, поэтому для работы нужно иметь предварительно прожаренные (2–2,5 ч при температуре 180°–210°С) в сушильном шкафу инструменты и посуду. Кроме суховоздушного способа посуду можно стерилизовать автоклавированием в течение 25 мин при 1–1,2 атм. Непосредственно перед работой инструменты помещают в этанол и прожигают рабочие поверхности в пламени спиртовки.

**Материалы и оборудование:** Тепличные растения табака, 6 % раствор хлорамина, колбы со стерильной дистиллированной водой, чашки Петри со стерильной питательной средой для индукций каллусогенеза, бокс для стерильных работ с ламинарным потоком воздуха; автоклав; рН-метр; инструменты (пинцеты, скальпели); лабораторная посуда: (стеклянная – чашки Петри, колбы, химические стаканы, мерные пипетки, пастеровские пипетки; чашки Петри одноразового применения); мембранные фильтры.

**Реактивы:** микро- и макросоли, сахара, фитогормоны, витамины, аминокислоты, антибиотики, агар; стерилизующие растворы (диоксид, хлоракс, 70 % этанол); стерильная дистиллированная вода;

#### Ход работы:

1. Листья табака поместить в стерилизующий раствор: 70 % этанол на 20 сек, затем промыть стерильной дистиллированной водой 3 раза.
2. Стерильным скальпелем вырезать срединную жилку листа с участком паренхимы: длиной 1,5–2 см, шириной 1 см.
3. Поместить экспланты на питательные среды (перед каждой манипуляцией инструменты обрабатывать спиртом и обжигать на пламени спиртовки).
4. Чашки Петри с эксплантами перенести в термостат для индукций каллусогенеза при температуре  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ .
5. Результаты зарисовать через 2–4 недели.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 12

### Культивирование опухолевых клеток человека и линий эмбриональных фибробластов человека

**Цель работы:** приобрести навыки работы по приготовлению ростовой FD среды для культивирования клеток человека и фибробластов.

Фибробласты и линии опухолевых клеток успешно культивируют на разных средах, но рекомендуется использовать следующий состав питательной среды: среда Игла – 90–85 %, сыворотка крупного рогатого скота (FBS) – 5–10 %, L-глутамин – 150 мг на 500 мл готовой среды, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Готовую среду и ее компоненты рекомендуется хранить при температуре +4°C.

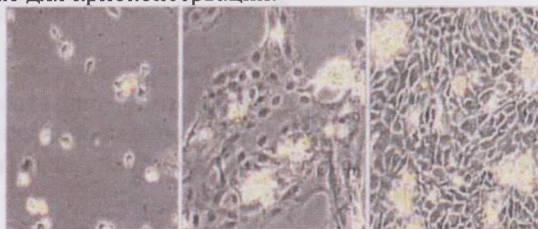
**Материалы и оборудование:** среда Игла – 90–85%, сыворотка крупного рогатого скота (FBS) – 5–10%, L-глутамин – 150 мг на 500 мл готовой среды, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина.

#### Ход работы:

##### Пересев клеток с помощью трипсина

Перед началом работы необходимо проверить наличие всей необходимой посуды и инструментов на столе ламинара. Обработать резиновые пробки всех сосудов с растворами горячей ватой, смоченной в 70° или 96° спирте. Удаляют питательную среду из культурального матраса и промывают растущую культуру клеток с помощью серологической пипетки и прикрепленной к ней груши (рис. 2, а) или автоматической микропипетки (рис. 2, б) 2–3 мл фосфатного буфера (DPBS), затем его сливают и добавляют 1–2 мл подогретого 0,05 % раствора трипсина (или смеси версен-трипсин).

Когда клетки занимают все пространство культурального матраса (это видно невооруженным глазом или при помощи бинокля) (рис. 1), их пересевают. Пересевы производят для получения количества клеток, достаточного для цитогенетического или биохимического исследования, а также для криоконсервации.



**Рисунок 1** – Формирование монослоя клеток



**Рисунок 2** – Использование серологической (а) и автоматической (б) пипеток для промывки и трипсинизации культуры клеток

Ход трипсинизации контролируют, просматривая культуры под микроскопом до появления первых признаков округления и всплытия клеток. Также о процессе трипсинизации можно судить по степени прозрачности раствора трипсина. Открепляясь от поверхности культуральной посуды, клетки выходят в раствор. При этом наблюдается его замутнение. Затем быстро нейтрализуют трипсин 2–4 мл FD среды (действие трипсина прекращается, когда объем нейтрализующей FD среды в 2 раза больше объема трипсина). Аккуратно ресуспендируют клетки пипеткой. Полученную суспензию клеток переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 5 минут при 1000 об./мин, далее сливают супернатант и ресуспендируют клетки в ростовой среде и высевают на новые культуральные матрасы.

Матрас с пересаженными растущими клетками просматривают ежедневно под микроскопом. Когда образуется монослой клеток, производят второй пересев (обычно через 3–6 суток).

### Подсчет клеток в камере Горяева

В процессе посева клеток после трипсинизации можно оценить состояние клеточной культуры, т. е. подсчитать общее количество клеток, а также выявить в их числе мертвые и живые клетки. Для этих целей существует простой метод подсчета клеток в гемоцитометре (камере Горяева), см. рис. 3.

Шлифованное покровное стекло притирают к предметному стеклу гемоцитометра до появления колец Ньютона, так, чтобы покрыть заштрихованные области. Это приводит к образованию камеры с фиксированным объемом, т.к. края предметного стекла подняты над заштрихованной поверхностью ровно на 0,1 мм.

Каждая заштрихованная область состоит из 9 больших квадратов размером  $1 \times 1$ , т. е. объем, ограниченный каждым большим квадратом, оказывается равным  $1 \text{ мм} \times 1 \text{ мм} \times 0,1 \text{ мм} = 0,1 \text{ мм}^3$ .



**Рисунок 3** – Подсчет клеток в камере Горяева

Отбирают часть клеточной суспензии пастеровской пипеткой и заполняют счетную камеру гемодитометра, используя капиллярное всасывание, не переполняя каналы камер.

Подсчитывают количество клеток в четырех больших квадратах в углах каждой из двух заштрихованных областей. Считают клетки, касающиеся правой и верхней ограничивающих линий, но не клетки, касающиеся левой и нижней ограничивающих линий. Поскольку объем большого квадрата составляет  $0,1 \text{ мм}^3$ , то, умножив усредненное значение числа клеток в одном квадрате на 104, получают количество клеток в 1 мл суспензии.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 13

### Культивирование микроорганизмов

#### Глубинное культивирование в жидкой питательной среде

**Цель работы:** изучить глубинное культивирование микроорганизмов в жидкой среде и изучить особенности культивирования суспензионных культур.

**Материалы и оборудование:** спиртовки, стерильные стеклянные пипетки на 5 или 10 мл, штатив со стерильными стеклянными пробирками на 10–15 мл, колбы с 10 мл жидкой питательной среды – питательного бульона (ПБ), чашки Петри с засеянной культурой бактерий *Escherichia coli B*, бактериологические петли, стаканы для использованных пипеток, маркер по стеклу.

#### Ход работы:

На первой пробирке отмечают название засеваемой культуры – *E. coli B* (опыт), на второй пробирке – К (контроль стерильности работы). На столе помещают спиртовку, пенал с пипетками кладут возле правой руки. Зажигают спиртовку, открывают пенал со стерильными стеклянными пипетками.

Все манипуляции с пробирками проводят вблизи пламени спиртовки. Пипеткой набирают 5 мл ПБ и добавляют 2,5 мл в первую пробирку, а оставшийся объем среды вносят во вторую пробирку. Бактериологическую петлю стерилизуют прокаливанием в пламени спиртовки, остужают о незасеянную область агаризованной среды в чашке Петри или о внутреннюю стерильную поверхность крышки чашки Петри.

Стерильным концом бактериологической петли снимают одну изолированную колонию бактерий и переносят в первую пробирку, тщательно ресуспендируют. В контрольную пробирку засевают бактерии не производят. Пробирки ставят в штатив и помещают в термостат (37 °С) для инкубирования в течение 18–24 ч. Проводят учет результатов, оценивая наличие роста бактериальной культуры по помутнению питательной среды. Если рост бактерий наблюдается только в опытной пробирке, следовательно, эксперимент был выполнен правильно.

## Культивирование на поверхности агаризованной питательной среды в чашке Петри

**Материалы и оборудование:** спиртовки, пенал со стерильными стеклянными пипетками на 1 или 2 мл, стерильные чашки Петри с агаризованной питательной средой (ПА), пробирку с культурой *E. coli B* в ПБ, закрывающуюся емкость с этиловым спиртом, шпатель Дригальского, стаканы для использованных пипеток, маркер по стеклу.

### Ход работы:

На дне чашки Петри подписывают название бактериальной культуры – *E. coli B*. Бактериальную культуру набирают пипеткой и 0,1 мл наносят на поверхность среды в чашке Петри. Шпатель стерилизуют методом обжигания в пламени спиртовки, остужают о внутреннюю поверхность крышки чашки Петри, после чего используют для засева бактериальной культуры на поверхность ПА. Чашку инкубируют в термостате (37°C). Через 24 ч выявляют наличие роста бактерий на поверхности агаризованной питательной среды.

1. Культивирование на поверхности скошенной агаризованной питательной среды.

Для работы необходимо иметь: спиртовку, чашку Петри с засеянной культурой бактерий *E. coli B*, флакон с расплавленным ПА, бактериологическую петлю, штатив со стерильными стеклянными пробирками, пенал со стерильными стеклянными пипетками на 5 или 10 мл, маркер по стеклу. На пробирке подписывают название культуры бактерий, с помощью пипетки вносят 5 мл расплавленной и охлажденной до 50°C питательной среды, после чего пробирки укладывают в наклонном положении на специальную подставку и дают среде застыть.

Через 20–30 мин засевают бактериальную культуру простерилизованной и охлажденной бактериологической петлей на всю поверхность скошенной среды, делая частые зигзагообразные движения, начиная со дна пробирки. Пробирку ставят в штатив, который помещают в термостат (37°C) на 24 ч, после чего анализируют рост бактерий по штриху.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №14

### Выделение из почвы микроорганизмов, продуцирующих гидролитические ферменты

**Цель работы:** выделить микроорганизмы из образца почвы и определить гидролитические свойства.

#### Общие сведения

Промышленное производство ферментных препаратов впервые началось в США в 1894 г. с получения грибной амилазы. Тогда этот фермент использовали в качестве лекарственного препарата при нарушениях пищеварения.

В настоящее время по объему производства ферменты занимают третье место после аминокислот и антибиотиков, причем основная их часть приходится на долю *гидролитических ферментов*. Среди гидролаз наибольшее применение получили пептидогидролазы (протеазы) и ферменты, расщепляющие гликозидные связи (амилазы, целлюлазы).

Ферментные препараты находят широкое применение в различных областях промышленности (текстильной, целлюлозно-бумажной, химической – при производстве моющих средств, пищевой, фармацевтической) и в сельском хозяйстве (как кормовые добавки, ветеринарные препараты).

Для промышленного получения ферментов используются штаммы бактерий *Bacillus*, грибов *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* и др. Их клетки способны выделять ферменты в культуральную жидкость, что значительно облегчает процедуру очистки ферментных препаратов. Продуктивность этих организмов увеличена путем мутагенеза и селекции, а также путем оптимизации процессов культивирования.

Процедура выделения потенциальных штаммов – продуцентов ферментов состоит из пяти основных этапов: взятия образцов, получения накопительных культур, получения чистых культур, проверки способности выделенных микроорганизмов продуцировать требуемые ферменты, описания свойств выделенных микроорганизмов.

#### Ход работы:

**1. Взятие образцов.** Для выделения бактерий, способных к образованию протеолитических, амилалитических и целлюлолитических ферментов, можно использовать подгнившие овощи и фрукты, почву с растительными остатками. Образец весом 30–40 г вносят в стерильную колбу на 250 мл, куда добавляют 40–50 мл стерильного физиологическо-

го раствора. Колбу 10 секунд интенсивно встряхивают, дают отстояться суспензии 30 мин.

**2. Получение накопительных культур.** Для получения накопительной культуры используются *селективные (элективные) среды*, в которых путем варьирования различных факторов создаются избирательные условия для преимущественного развития продуцента определенных веществ. Это позволяет проводить процедуру обогащения.

*Обогащение* – процесс, обеспечивающий подходящие условия для выращивания и воспроизводства определенных микроорганизмов. Для других же микроорганизмов эти условия будут летальны или значительно замедлят их рост. Селективная питательная среда должна содержать в качестве источников углерода определенные соединения, предназначенные для отбора микроорганизмов, способных их утилизировать, либо ингибиторы, блокирующие специфические биохимические пути. Среда должна характеризоваться оптимальными для выделяемых микроорганизмов значениями pH, температуры и осмотического давления. Полученные в таких условиях культуры называют *накопительными*.

При первичном скрининге производят отбор из крупной популяции организмов, имеющих специфическую активность. Это преимущественно качественный отбор. Большинство методов скрининга можно разделить на: прямые (которые предполагают специфическую идентификацию требуемого продукта, например, при использовании хроматографических методов); непрямые, такие как детекция фермента с помощью колориметрических или флуориметрических реакций, проходящих при наличии ферментативной активности.

Для роста выделяемых микроорганизмов используют агаризованные среды, содержащие субстрат для определенного фермента. Наличие у бактерий ферментативной активности можно определить при появлении вокруг колоний продуцента зон просветления, которые являются результатом гидролиза субстрата (например, гидролиза белков молока), либо зон, выявляемых после постановки колориметрической реакции (например, реакции на крахмал с реактивом Люголя).

Такой скрининг проводится быстро, является недорогим и при этом сразу можно исследовать большое количество колоний.

Для выделения бактерий, способных к образованию *амилаз*, высевают производят на минимальную агаризованную среду, содержащую солевой концентрат 5А как источник макро- и микроэлементов; в качестве единственного источника углерода добавлен крахмал в конечной концентрации 0,05 %.

Чтобы выделить бактерии, способные образовывать *протеолитические* ферменты, высевают производят на минимальную среду, в которой в

качестве единственного источника углерода добавлено обезжиренное молоко в конечной концентрации 0,7 %.

Для выделения бактерий, способных к образованию *целлюлаз*, высев производят на минимальную среду, в которой в качестве единственного источника углерода добавлена карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) в конечной концентрации 0,05 %.

Для приготовления 400 мл минимальной среды используют солевой концентрат 5А – 80 мл, расплавленный 2 % водный агар – 300 мл. Добавляют стерильную дистиллированную воду до 400 мл.

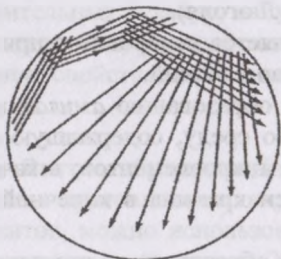
*Солевой концентрат 5А*

$K_2HPO_4$	52,5 г
$KH_2PO_4$	22,5 г
$(NH_4)_2 SO_4$	5,0 г
Цитрат натрия $2H_2O$	2,5 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл

После автоклавирования добавляют 5 мл стерильного 1 М раствора  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  на 1 литр концентрата.

*Высев бактерий из образцов* производят с помощью шпателя по методу Коха, последовательно используя три чашки Петри. а поверхность среды в первой чашке стерильной пипеткой наносят 0,1 мл образца, распределяют суспензию с помощью шпателя Дригальского. Далее, не стерилизуя шпатель, продолжают распределять образец сначала по поверхности среды во второй, а затем в третьей чашке. После соответствующего времени инкубирования (1–3 дня) при 28°C чашки просматривают и отбирают для дальнейшей работы 4–5 морфологически различающихся типов колоний. Обычно на первой чашке наблюдается сплошной рост микроорганизмов, а на второй и третьей – рост изолированных колоний.

**3. Получение чистых культур** Отобранные колонии засевают методом истощающего штриха (рис. 1) на среды такого же состава, как и для получения соответствующих накопительных культур.



**Рисунок 1** – Техника посева, порядок нанесения (1–4) бактериальной культуры на поверхность агаризованной питательной среды в чашке Петри методом истощающего штриха

**4. Проверка способности выделенных микроорганизмов продуцировать гидролитические ферменты.** Проверка способности выделенных микроорганизмов продуцировать требуемые ферменты – важный этап в селекции промышленных микроорганизмов. В отличие от первичного скрининга он представляет собой как качественный, так и количественный отбор. Его целью является подтверждение способности организмов, выделенных при первичном скрининге, продуцировать определенные ферменты и оценка их продуктивного потенциала. На этом этапе избавляются от всех организмов, которые обладают ложноположительной и низкой активностью.

Для проверки способности продуцировать требуемые гидролазы у выделенных ранее микроорганизмов высев производят на чашки такого же состава, как и в случае получения чистых культур. Чашки инкубируют в течение суток при 28°C.

О наличии *протеолитической активности* судят по появлению прозрачных зон гидролиза белков молока вокруг колоний.

При исследовании *амилолитической активности* чашку с выросшими клонами заливают раствором, содержащим 0,5 % I<sub>2</sub> и 5 % KI, и о наличии активности судят по образованию зон просветления вокруг колоний.

При проверке на *целлюлолитическую активность* чашку с выросшими клонами заливают 1 % водным раствором красителя Конго красного на 20 мин (происходит связывание красителя с целлюлозой), затем краситель сливают, чашки промывают 8 % водным раствором NaCl (для вымывания красителя из агара). О наличии целлюлолитической активности судят по образованию зон просветления вокруг колоний.

### **Контрольные вопросы:**

- 1 Что такое ферменты?
- 2 Какие ферменты образуются в клетках микроорганизмов?
- 3 Как выявляют амилолитическую и протеолитическую активность?
- 4 Какие факторы влияют на ферментативную активность микроорганизмов?

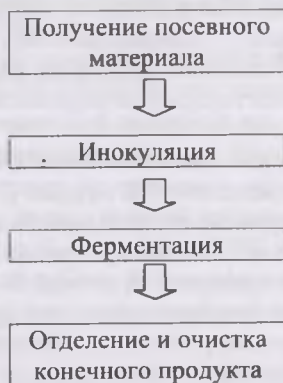
## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 15

### Методы выделения и очистки целевого биотехнологического продукта

**Цель работы:** знакомство с методами, применяемыми для отделения готового продукта (отделение продукта (клеточной массы) методом осадочной фильтрации; отделение продукта (клеточной массы) методом мембранной фильтрации; отделение продукта (клеточной массы) методом центрифугирования).

#### Общие сведения

Биотехнологический процесс получения любого продукта можно схематично представить в виде следующих этапов:



Целью любого биотехнологического процесса, используемого в промышленности, является получение какого-либо продукта. Конечными продуктами биотехнологических процессов может быть, например, клеточная биомасса (производство кормовых дрожжей), белок (производство дрожжевого и бактериального белка), продукты жизнедеятельности микроорганизмов (органические кислоты, антибиотики, биогаз) и т. д.

В зависимости, что именно является конечной целью биотехнологического процесса, для отделения конечного продукта используют различные методы. Для концентрирования конечного продукта используют различные физические и химические свойства частиц и молекул (вес,

поверхностное натяжение, растворимость, заряд, температура кипения, способность к диффузии, размеры).

Так, для отделения клеток используют осаждение, фильтрацию (в том числе мембранную), центрифугирование, флотацию. Такие методы используют, например, при разделении водно-масляной смеси, очистке сточных вод (аэробной и анаэробной), получении клеточной биомассы (дрожжи) и т. п.

Помимо самих клеток конечными продуктами могут быть внутриклеточные метаболиты или выделившиеся во внешнюю среду внеклеточные метаболиты. В любом случае первым этапом должно быть отделение клеток от среды.

Далее может следовать разрушение отделенных клеток (если требуется отделение внутриклеточных продуктов). Клетки могут быть разрушены следующими методами:

- физическими (ультразвуком, замораживанием – оттаиванием, прессованием, размолотом в шаровых мельницах);

- химическими (лиофилизацией, экстракцией, обработкой детергентами, кислотами);

- биологическими (ферментами, фагами, ингибиторами).

После разрушения клеток или при выделении продукта из культуральной среды для максимального извлечения продуктов используются методы:

- экстрагирования (используя свойства гидрофильности и гидрофобности);

- хроматографии (адсорбционная, ионообменная, гель-хроматография – вещества разделяются по молекулярному весу);

- мембранных процессов (ультрафильтрация, обратный осмос, диализ);

- кристаллизации и осаждения;

- высушивания (конвективное – в потоке воздуха, контактное – с адсорбентом, сушка после замораживания – лиофилизация).

*Фильтрация.* Для получения бактериальных клеток из культуральной среды часто используют два типа фильтрации: осадочная и мембранная. Часто для улучшения отделения клеточной массы от жидкости используют добавление веществ, увеличивающих размеры бактериальных агрегатов – флокулянтов (например, полиакриламид).

Для осадочной фильтрации используют высокопористые материалы с глубокими и извилистыми порами. Фильтровальная система состоит из подложки фильтра (фильтровальная бумага или ткань, крупнопористые) и толстого слоя фильтрующего материала (целлюлозы, диатомовой земли и т. п.). При фильтровании бактерии, по мере их накопления, соскаб-

ливают с поверхности фильтра. Такой способ позволяет хорошо очистить фильтрат, но для стерилизации сред неприменим, а биомасса часто оказывается загрязненной фильтрующим материалом.

Мембранная фильтрация основана на задержке бактерий на поверхности фильтра с порами, диаметр которых изменяется в узких пределах. Выбор мембраны зависит от характеристик культуры и, что именно желают получить в качестве продукта – клетки или фильтрат. Так, при стерилизации фильтрованием, требуется мембрана с диаметром пор менее 0,5 мкм (размеры клеток 1,5–0,5 мкм).

*Центрифугирование.* Этот способ дает менее полное разделение, чем фильтрация. Но такой способ дает возможность получить среду и клетки, незагрязненные фильтрующим материалом. Скорость осаждения в процессе центрифугирования зависит от таких факторов, как вязкость среды, размер частиц и разница в плотности между частицами и средой. Все типы центрифуг работают по принципу регулируемого приложения центробежной силы во вращающемся роторе.

*Оценка концентрации клеточной биомассы.* Отделение клеток от среды является также составной частью при оценке концентрации клеток в среде. Для подсчета количества микроорганизмов в исследуемом образце существует большое количество методов. Приведём наиболее распространенные методы количественного учета микроорганизмов.

1. Методы прямого счета микроорганизмов (в определенном объеме пробы или в навеске). Методы сводятся к подсчету количества клеток микроорганизмов в определенном объеме микробной суспензии непосредственно под микроскопом, пересчитывая далее численность микроорганизмов на единицу веса или объема (вес – для твердых тел, объем – для жидкостей и газов). Подсчет клеток ведут на фиксированных окрашенных мазках (почва, илы, растения и растительные остатки), с использованием мембранных фильтров (вода, воздух), используя световую или электронную микроскопию.

2. Количество микроорганизмов можно рассчитать по количеству органического азота или углерода. Используется в биотехнологии, при культивировании микроорганизмов там, где используют чистые культуры.

3. Количество бактерий можно рассчитать по оптической плотности микробной суспензии. Используется в биотехнологии, при культивировании микроорганизмов, в медицине.

4. Метод высева на плотные питательные среды (в чашки Петри). Этим методом учитывается не общее количество микроорганизмов в исследуемом образце, а численность различных физиологических групп микроорганизмов или организмов. В зависимости от используемой пи-

тательной среды это могут быть сапрофиты, сульфатредукторы, аммонификаторы, нитрификаторы, денитрификаторы, железобактерии и т. д. Метод сводится к приготовлению разведений пробы и посева разведенных образцов на питательные среды различного состава с последующей инкубацией посевов и подсчетом выросших колоний. Условно принимается, что из одной клетки вырастает одна колония.

5. Метод предельных разведений, метод титра. Сущность этого метода состоит в следующем. В пробирки или колбы со средой вносят определенной объем, взятый из различных разведений исследуемой пробы. После инкубации регистрируют наличие или отсутствие роста в посевах, результаты обрабатывают статистически с помощью специальных таблиц и рассчитывают число микроорганизмов, содержащихся в единице веса или объема образца.

Способы оценки численности организмов в среде, используемые в промышленности позволяют быстро получить результат. Обычно оценивают концентрацию клеток в среде либо оптическими методами (легко автоматизировать), либо прямым подсчетом под микроскопом, либо весовым – аналогично определению концентрации взвешенных веществ в объеме (по разнице в весе между фильтром с осадком и без). Вес может быть сырым или сухим (после сушки образца) и т. д.

**Материалы и оборудование:** мембранные фильтры; установка для фильтрации; бумажные фильтры; целлюлозное волокно; колба Бунзена; воронка Бюхнера; центрифуга с центрифужными пробирками; мерные цилиндры на 100 см<sup>3</sup>; стаканы объемом 250 см<sup>3</sup>; флокулянты (например, раствор полиакриламида); весы; взвешенные бюксы; образцы разделяемых смесей (культура дрожжей, смешанная культура микроорганизмов аэробного активного ила).

#### **Ход работы:**

1. *Осадочная фильтрация.* Присоединить воронку к колбе Бунзена, соединить колбу с водоструйным насосом. На воронку положить крупнопористую фильтровальную бумагу, на нее налить суспензию целлюлозного волокна в воде. На фильтре должен получиться ровный слой целлюлозы толщиной 0,5–1 см. Если нет возможности использовать целлюлозное волокно – фильтрация через бумажный фильтр. Профильтровать 250 мл разделяемой смеси. Оценить (визуально) степень прозрачности отфильтрованной жидкости. Соскоблить слой осажденных клеток, взвесить, поместив в бюкс.

Рассчитать сырую клеточную массу (г/л) = (Вес бюкса с клетками, г, – Вес пустого бюкса, г) : Объем жидкости, мл, × 1000 (1000 – пересчет в г/л).

Оценить степень загрязненности клеток фильтрующим материалом (визуально).

2. Взвесить мембранный фильтр. Профильтровать через мембранный фильтр 50–100 мл смеси. Оценить степень прозрачности фильтрата. Взвесить фильтр с осадком.

Рассчитать сырую клеточную массу (г/л) = (Вес фильтра с клетками, г, – Вес пустого фильтра, г) : Объем жидкости = 1000 мл.

3. Провести разделение осадочным фильтрованием, добавив предварительно к разделяемой смеси полиакриламид (1 мг раствора на 100 мл смеси). Концентрацию сырой биомассы рассчитывать не нужно. Сравнить прозрачность фильтрата, скорость фильтрации с аналогичными без использования полиакриламида.

4. Взвесить две центрифужных пробирки. Измерить объем жидкости, помещающийся в пробирку. Налить в пробирку разделяемую смесь. Поставить пробирки в центрифугу. Пробирки должны быть одинаково наполненными и попарно уравновешенными. Надеть крышку, завинтить. Закрыть кожух. Выставить время центрифугирования. Включить центрифугу. До полной остановки центрифуги открывать крышку нельзя!

Разделение центрифугированием выполняется в течение 5 мин в двух вариантах – при скорости 1000 и 8000 об./мин. По окончании процесса визуально оценить прозрачность жидкости, слить надосадочную жидкость. Взвесить пробирку с осадком, рассчитать концентрацию биомассы (г/л).

Рассчитать сырую клеточную массу (г/л) = (Вес пробирки с клетками, г, – Вес пустой пробирки, г) : Объем жидкости, мл, × 1000 (1000 – пересчет в г/л).

#### Задания:

1. Определить количество продукта (клеточной массы) методом осадочной фильтрации.

2. Определить количество продукта (клеточной массы) методом центрифугирования.

3. Определить количество продукта (клеточной массы) методом центрифугирования.

4. Сравнить полученные результаты оценки концентрации клеток в среде. Указать причины различия результатов оценки концентрации.

- 5 Сравнить методы, сделать вывод об эффективности каждого из них.
- 6 Заполнить таблицу 1, сделав необходимые расчеты.
- 7 Записать вывод по эффективности способов отделения клеточной массы от культуральной среды.
- 8 Записать вывод по сравнению результатов оценки концентрации клеток в среде. Указать причины различия результатов оценки концентрации.

**Таблица 1 – Отделение клеток от субстрата  
центрифугированием и фильтрацией**

<b>Метод</b>	<b>Оценка концентрации сырой клеточной биомассы, г/л</b>	<b>Оценка надосадочной жидкости</b>	<b>Оценка осадка, легкости его отделения</b>

### Контрольные вопросы

- 1 Что может выступать в роли конечных продуктов в биотехнологических процессах?
- 2 Какие основные методы сбора биомассы вы знаете? Дайте краткую характеристику этим методам.
- 3 Как можно разрушить биомассу и отделить осколки клеток от супернатанта?
- 4 Какие свойства используют для отделения конечных продуктов?
- 5 Как можно оделить клеточную биомассу от среды?
- 6 Что используют для выделения конечных продуктов, находящихся в клетках?
- 7 Какие методы применяют для выделения продуктов, накапливающихся в культуральной среде?
- 8 Какие методы оценки концентрации клеток в среде вы знаете?

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Бекер М. Е., Лиепиныш Г. К., Райнулис Е. П. Биотехнология. – М.: «Агропромиздат», 1990. – 232 с.
- 2 Егорова Т. А., Клунова С. М., Живухина Е. А. Основы биотехнологии. – М.: «Академия», 2003. – 208 с.
- 3 Елинов Н. П. Основы биотехнологии. – СПб.: «Наука», 1995. – 601 с.
- 4 Современная микробиология. Прокариоты (в 2-х томах) / Под ред. Г. Дрекса, Г. Шлегеля и др. – М.: Мир, 2005. – 1152 с.
- 5 Ботаника. Систематика высших, или наземных растений / Еленевский А. Г., Соловьева М. П., Тихомиров В. Н. – М.: Академия, 2006. – 432 с.
- 6 Экобиотехнология фототрофных микроорганизмов: Монография. – Алматы: «Арыс», 2011. – 380 с.
- 7 Игнатова Л. В. Основы микробиологии: Учебное пособие. – Алматы, 2008. – 128 с.
- 8 Нетрусов А. И., Котова И. Б. Общая микробиология. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 284 с.
- 9 Шигаева М. Х., Цзю В. Л. Общая микробиология. – Алматы. Изд-во Казак университеті. 2008. – 320 с.
- 10 Шарова И. Х. Зоология беспозвоночных. – М.: ВЛАДОС, 2002. – 592 с.
- 11 Догель В. А. Зоология беспозвоночных: Учебник для ун-тов / Под ред. проф. Полянского Ю. И. – 7-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1981. – 606 с., ил.
- 12 Зоология беспозвоночных. В 2-х томах / Под ред. В. Вестхайде и Р. Ригера. – М., 2008. – 1208 с.
- 13 Нестерова С. Г. Лабораторный практикум по «Систематике растений»: Учеб.-метод. пособие. – Алматы, 2011. – 82 с.
- 14 Белякова Г. А. Ботаника: в 4 т. Т. 1–2. Водоросли и грибы. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 570 с.
- 15 Водоросли: Справочник / С. П. Вассер, Н. В. Кондратьева, Н. В. Масько и др. – Киев: Наукова думка, 1989. – 605 с.
- 16 Гарьбова Л. В. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 220 с.
- 17 Горбунова Н. П. Альгология. – М.: Высшая школа, 1991. – 256 с.
- 18 Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В. С., Калашникова Е. А., Дегтярев С. В. и др. – М.: Высшая школа, 2004. – 386 с.

- 19 Кригер О. В., Гореликова Г. А. Основы биотехнологии: учебное пособие. – Кемерово, 2009. – 116 с.
- 20 Бейли Д., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. В 2-х частях. – М.: «Мир», 1989. – 671 с.
- 21 Спирер Р. Е., Гриффитс Дж. Биотехнология клеток животных. В 2-х томах. – М.: Агропромиздат, 1989. – 810 с.
- 22 Гончаренко Г. Г. Основы биотехнологии. – Гомель, 2005. – 178 с.
- 23 Щелкунов С. Н. Генная инженерия. – Новосибирск: Изд-во Новосибир. гос. ун-та, 2004. – 514 с.
- 24 Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
- 25 Варфоломеев С. Д., Калужный С. В. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов. – М.: «Высшая школа», 1990. – 270 с.
- 26 Варфоломеев С. Д., Панцхава Е. С. Биотехнология преобразования солнечной энергии. Современное состояние, проблемы, перспективы // Биотехнология. – М.: Наука, 1984. – 282 с.
- 27 Виестур У. Э., Шмите И. А., Жилевич А. В. Биотехнология: биотехнологические агенты, технология, аппаратура. – Рига: «Зинатне», 1987. – 294 с.
- 28 Голубев В. Н., Жиганов И. Н. Пищевая биотехнология. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 352 с.
- 29 Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов. – СПб.: ГИОРД, 2003. – 243 с.
- 30 Кислухина О., Кюдулас И. Биотехнологические основы переработки растительного сырья. – Каунас: «Технология», 1997. – 210 с.
- 31 Кислухина О. В. Ферменты в производстве пищи и кормов. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 336 с.
- 32 Чиркин А. А. Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК. – Витебск: Издательство УО «ВГУ им. П. М. Машерова», 2004. – 285 с.
- 33 Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. – М.: «Агропромиздат», 1987. – 371 с.
- 34 Гриневич А. Г., Босенко А. М. Техническая микробиология. – Минск: «Высшая школа», 1986. – 392 с.
- 35 Кулаковская Т. В. Лабораторный практикум по биотехнологии: Учеб. пособие. – Минск: БГПУ им. М. Танка, 2001. – 45 с.
- 36 Методическое руководство к лабораторным занятиям по культуре тканей и биотехнологии растений / Мухамбетжанов С. К., Валяхина Г. Ж., Ережепов А. Е.. – Шымкент, 2007. – 68 с.

- 37 Тырков А. Г. Биоорганическая химия: курс лекций. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2009. – 236 с.
- 38 Инженерная энзимология / Березин И. В., Клесов А. А., Швядас В. К. и др. – М.: Высшая школа, 1987. – 144 с.
- 39 Практикум «Основы электронной микроскопии для биологов. Подготовка клеточных культур к электронно-микроскопическому исследованию»: метод. пособие / Максимова Д. А., Губанова Н. В., Корчагина К. В., Шестопалова Л. В. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2011. – 17 с.
- 40 Русь О. Б. Введение в биотехнологию: практикум. – Минск: БГУ, 2011. – 97 с.

## СЛОВАРЬ ОСНОВНЫХ ТЕРМИНОВ

**Антибиотики** (от греч. anti – против, bios – жизнь) – вещества биологического происхождения или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (бактериям, грибам, водорослям, протистам) либо к тканям злокачественных опухолей, избирательно задерживая их рост или полностью подавляя развитие.

**Апекс** – верхушечная часть стебля или корня.

**Апикальное доминирование** – явление подавления роста боковых почек побега в присутствии терминальной почки.

**Асептика** – комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания в среду посторонней микрофлоры. А. достигается стерилизацией питательных сред, оборудования, инструментов, включает обработку ультрафиолетовым облучением и химическими веществами, оказывающими бактерицидное или бактериостатическое действие, инструментов, оборудования и помещений; подачу стерильного воздуха в ферментеры и др.

**Ауксотрофы** (от греч. auxano – выращиваю, увеличиваю, trope – пища, питание) – микроорганизмы, утратившие способность к самостоятельному синтезу одного или нескольких веществ – факторов роста (напр., аминокислот, витаминов, нуклеотидов). Для культивирования А. в питательной среде необходимо присутствие соответствующих факторов роста.

**Ацидофилы** (от лат. acidus – кислый, phileo – люблю) – микроорганизмы, обитающие в средах при значениях pH 0–5,0; напр., *Thiobacillus ferrooxidans*, *Sulfolobus*, *Acetobacter*.

**Аэрация** – процесс естественного или искусственного поступления кислорода в какую-либо среду (воду, почву и т. д.).

**Аэробы** – организмы, развивающиеся в присутствии свободного кислорода и использующие его в качестве конечного акцептора электронов в окислительно-восстановительных реакциях.

**Аэробы облигатные** – организмы, не способные существовать в отсутствие свободного кислорода.

**Анаэробы** – организмы, способные к жизнедеятельности в отсутствие молекулярного кислорода.

**Анаэробы облигатные** – организмы, способные существовать только в условиях полного отсутствия молекулярного кислорода.

**Анаэробы факультативные** – организмы, способные существовать как в отсутствие, так и в присутствии молекулярного кислорода, пере-

ключая свой энергетический метаболизм с брожения (анаэробного дыхания) на аэробное дыхание.

**Аэротенк** – сооружение для биологической очистки сточных вод, представляющее собой несколько проточных резервуаров, продуваемых воздухом.

**Ауксины** – фитогормоны (ИУК, НУК, 2,4-Д), активизирующие рост стеблей и корней, стимулирующие образование корней у проростков.

**Бактерии** (от греч. *bakterion*, уменьш. от *bastron* – трость, посох) – группа микроскопических одноклеточных организмов, не имеющих обособленного ядра, роль которого чаще всего выполняет единственная хромосома.

**Бактериофаги, фаги** – вирусы, репродуцирующиеся в бактериальных клетках.

**Бакуловирусы** – группа вирусов палочковидной формы, объединенных в семейство *Baculoviridae*, патогенных для насекомых, принадлежащих преимущественно к отрядам Чешуекрылых, Двукрылых и Перепончатокрылых; не патогенны для человека и позвоночных животных. Они рекомендованы Всемирной организацией здравоохранения для применения в качестве избирательно действующих инсектицидов для контроля численности насекомых-вредителей сельскохозяйственных культур.

**Биоремедиация** (от греч. *bios* – жизнь, лат. *remedium* – лекарство) – использование биологических объектов для борьбы с загрязнением окружающей среды. Наибольшее распространение в Б. получили микроорганизмы, способные к деградации и ассимиляции различных соединений, в том числе ксенобиотиков. Одним из способов Б. является фиторемедиация, представляющая собой использование зеленых растений для очистки вод, почв и атмосферного воздуха.

**Биосенсоры** – аналитические устройства для определения наличия или концентрации веществ с помощью биоматериала (чаще иммобилизованного). Биоматериалом могут служить ферменты, антигены/антитела, нуклеиновые кислоты, клеточные органеллы, липосомы, живые клетки. Большинство Б. ориентировано на анализ биологических жидкостей. Любой Б. состоит из двух элементов: биоселектирующей мембраны, использующей различные биологические структуры, и физического преобразователя сигнала, трансформирующего концентрационный сигнал в электрический. Преобразователи могут быть электрохимическими (электроды), оптическими, гравитационными, колориметрическими, резонансными системами. Возможна комбинация между любыми разновидностями основных элементов Б. Наибольшее развитие получили ферментные Б. (ферментные электроды) и клеточные Б. на ос-

нове иммобилизованных микроорганизмов. Б. широко применяются в медицинской диагностике, пищевой промышленности, в технике, в области охраны окружающей среды.

**Биотехнология** – технологическое использование биологических явлений и процессов для получения полезных продуктов, товаров и услуг; направление научной и практической деятельности человека, основанное на использовании биологических объектов в промышленных целях.

**Биотрансформация** – превращение исходных органических соединений (предшественников) в целевой продукт с помощью клеток живых организмов или выделенных из них ферментов.

**Биофильтр** – устройство, содержащее фильтр из дробленого пористого камня или шлака, на поверхности которого развивается сложная по составу неподвижная биопленка из микроорганизмов, в том числе грибов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Leptomitus*, разлагающих растворенное органическое вещество. Б. применяется для очистки сточных вод и загрязненного воздуха.

**Бинарное деление** – прямое, не связанное с половым процессом разделение прокариотической клетки на примерно одинаковые по размерам дочерние клетки.

**Биогаз** – смесь метана и двуокиси углерода, а также следов других газов, таких как водород, азот, сероводород, и водяных паров, получаемая из биомассы в анаэробных условиях.

**Биогенные элементы** – химические элементы, относящиеся к группе макроэлементов и включающие С, Н, N, О, Р, S. Биодegradация – процесс разрушения загрязняющих окружающую среду веществ, образовавшихся в процессе деятельности людей, преимущественно посредством микроорганизмов.

**Биоконверсия** – превращение метаболитов в структурно родственные соединения под действием микроорганизмов.

**Биоконтроль** – процесс ограничения роста и развития патогенных микроорганизмов с помощью их естественных антагонистов или образующих ими метаболитов.

**Биологически активные вещества (БАВ)** – органические соединения, оказывающие влияние на метаболизм и другие функции в организме и обладающие высокой активностью и специфичностью. Многие БАВ являются целевыми продуктами биотехнологического производства.

**Биомасса** – клеточная масса, образующаяся в результате жизнедеятельности живых организмов.

**Биореактор, ферментер** – устройство, в котором протекают биохимические реакции при участии живых микроорганизмов, клеточных экстрактов или ферментов. Часто этот термин относится к сосуду, в котором растут микроорганизмы.

**Брожение** – метаболический процесс, осуществляемый микроорганизмами, при котором образуется АТФ, а продукты расщепления органического субстрата могут служить одновременно и донорами и акцепторами водорода. Типы брожения различаются в зависимости от того, какие конечные продукты преобладают (например, спиртовое, уксуснокислое, молочнокислое, маслянокислое и т. д.).

**Вирус** – инфицирующий комплекс, состоящий из РНК (ортомиксовирусы, парамиксовирусы, ретровирусы, рабдовирусы и др.) или ДНК (аденовирусы, герпесвирусы, гепаднавирусы, бакуловирусы и др.), белковой оболочки (капсида), а у ряда В. – липополисахаридной оболочки (суперкапсида). Вирусы способны репродуцироваться только в живых клетках организма-хозяина.

**Время генерации культуры**, время удвоения культуры ( $t_d$ ) – время, необходимое для удвоения количества клеток в экспоненциально растущей популяции одноклеточных организмов.

**Вторичный метаболит** – вещество, не являющееся обязательным для роста или функционирования клетки, но синтезирующееся в стационарной фазе (обычно участвует в защите клеток или микроорганизмов от тех или иных воздействий).

**Время генерации клетки** – интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями.

**Время удвоения популяции** – интервал времени, за который число клеток в популяциях увеличивается вдвое.

**Гиббереллины** – фитогормоны (ГК и др.), активизирующие рост стеблей, вызывающие прорастание семян.

**Генетически модифицированный организм (ГМО)** – организм, в геном которого с помощью методов генетической инженерии перенесен фрагмент чужеродной ДНК.

**Гетеротрофы** – микроорганизмы, для которых источником углерода и азота служат органические вещества. Они усваивают органические углеродсодержащие соединения: углеводы, органические кислоты, спирты и углеводороды.

**Глубинное культивирование** – выращивание микроорганизмов в условиях, когда мицелий погружен в жидкую аэрируемую питательную среду на весь период ферментации. Глубина погружения различна (0–10 м) и зависит от массообмена, вызываемого аэрацией, конструкции мешалки и других факторов.

**Дедифференциация** – переход специализированных, неделящихся клеток к образованию недифференцированных делящихся каллусных клеток.

**Дифференциация** – комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

**Дифференцировка** – состояние специализации клеток, отличающее их от других.

**Дрожжи** – внетаксономическая группа одноклеточных грибов, размножающихся почкованием или, в редких случаях, делением. Существуют аспорогенные формы – дрожжи, у которых половая стадия неизвестна (напр., род *Candida*), и спорообразующие формы, способные к образованию аскоспор (род *Saccharomyces*) или базидиоспор (род *Sporobolomyces*). К дрожжам относят около 1500 видов организмов, принадлежащих более чем к 100 родам.

**Инокулюм** – часть клеточной суспензии, используемая для переноса на свежую питательную среду.

**Иммобилизация** – ограничение подвижности молекул или клеток посредством их связывания с каким-либо веществом. В биотехнологии широко применяют разнообразные физические и химические методы И. клеток и ферментов.

**Иммортиализованные клетки** – клетки, которые продолжают расти и делиться *in vitro* в течение длительного времени при наличии подходящих условий культивирования («бессмертные клетки»). К ним относят опухолевые и трансформированные клетки.

**Каллус** – ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений.

**Клон** (от греческого *klon* – черенок или побег, пригодный для размножения растений) – совокупность клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле. Термин "клон" был предложен в 1903 году Уэбстером.

**Клеточная линия** – группа клеток, поддерживаемая в культуре путем пересевов.

**Клеточная инженерия** – метод создания клеток нового типа путем слияния клеток, протопластов, субклеточных структур, а также введения в клетки чужеродных органелл, включающий культивирование клеток *in vitro*. С помощью К. и. удастся объединять геномы разных видов (даже принадлежащих к различным царствам), например, при образовании искусственных ассоциаций растительных клеток с цианобактериями.

**Клон** – популяция клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.

**Клонирование** – совокупность процедур, использующихся для получения клонов. Клонирование многоклеточных организмов, например, включает пересадку ядер соматических клеток в оплодотворенное яйцо с удаленным пронуклеусом.

**Клонирование животных** – совокупность процедур, включающих пересадку ядра соматической клетки клонируемого организма в яйцеклетку другого организма с удаленным пронуклеусом.

**Клональное микроразмножение** – получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному растению.

**Кривая роста бактериальной культуры** – зависимость количества клеток в популяции от времени культивирования.

**Культура** – популяция клеток или микроорганизмов, выращиваемых в контролируемых условиях *in vitro*.

**Культура клеток (суспензионная культура)** – выращивание отдельных клеток или небольших групп их во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

**Культура каллусных тканей** – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов (пыльники, семяпочки и т. д.) растений.

**Культура опухолевых тканей** – выращивание в длительной культуре сегментов, изолированных из растительных опухолей разного происхождения и освобожденных от патогенов, индуцировавших развитие опухоли.

**Культура эксплантов** – инкубация в стерильных условиях на питательных средах, либо вызывающих, либо не вызывающих пролиферацию сегментов, изолированных из разных органов растений.

**Культура тканей *in vitro*** – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений.

**Культуральная среда** – твердая или жидкая среда, используемая для выращивания микроорганизмов *in vitro*.

**Линия** – культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

**Метаболизм** – совокупность физических и химических процессов, протекающих в организме и обеспечивающих его существование. Продукты метаболизма называются метаболитами.

**Микронъекция** – введение в изолированную эукариотическую клетку ДНК или других молекул с помощью тонкой иглы.

**Микроорганизмы**, микробы (от греч. *micros* – малый) – микроскопически малые организмы (до 500 мкм), преимущественно одноклеточные – бактерии, одноклеточные грибы, водоросли, простейшие, клетки которых нельзя увидеть невооруженным глазом.

**Меристема** – образовательные ткани с активно делящимися недифференцированными клетками.

**Монослойная культура клеток** – культура клеток животных, растущая в виде слоя клеток, прикрепленного к поверхности культурально-го сосуда. Поверхность для прикрепления клеток может представлять собой стекло, пластик либо металл.

**Морфогенез *in vitro*** – процесс формообразования, то есть заложения, роста и развития клеток (цитогенез), тканей (гистогенез) и органов (органогенез) в культуре клеток и тканей *in vitro*.

**Мутация** – изменения в генетическом материале клеток путем перестройки ДНК ядер и органелл, изменений в структуре хромосом или уровне плоидности организма.

**Объекты биотехнологии** – бактерии, грибы (микро- и макромикеты), водоросли, клетки (ткани) растений, животных, человека, а также вирусы и выделенные из клеток ферменты, в том числе иммобилизованные.

**Объекты биотехнологии базовые** – микроорганизмы, безопасные для человека, для которых имеется достаточная физиолого-биохимическая и генетическая характеристика и опыт применения в биотехнологическом производстве, поэтому они могут служить основой для разработки нового биотехнологического процесса (см. GRAS), а также наиболее используемые в биотехнологическом производстве линии клеток (напр., линии СНО, ВНК и др.).

**Объекты биотехнологии модельные** – микроорганизмы, которые легко культивировать в лабораторных условиях, о которых накоплено много научных данных (геном секвенирован, изучены процессы метаболизма). К ним относятся *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

**Объекты биотехнологии промышленные** – конкретные штаммы микроорганизмов и линии клеток, с использованием которых налажено крупномасштабное биотехнологическое.

**Органогенез** – процесс возникновения в неорганизованной растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней, листовых зачатков и побегов).

**Первичная культура** – культура клеток или тканей, взятых непосредственно от организма.

**Первичная культура клеток** – культура животных клеток, полученная из ткани и выращиваемая *in vitro* до начала субкультивирования, т. е. до первого пересева.

**Популяция клеток** – совокупность культивируемых клеток.

**Пробиотики** – бактериальные препараты из живых микробных культур, предназначенные для коррекции микрофлоры хозяина и лечения ряда заболеваний.

**Прокариоты** – организмы, у которых нет ограниченных мембранами ядра и органелл. К прокариотам относятся все бактерии.

**Протопласт** – бактериальная, дрожжевая или растительная клетка, стенка которой разрушена ферментативным или химическим путем.

**Пролиферация** – новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

**Периодическая (закрыва́тая) система культивирования** – система культивирования микроорганизмов, в которой хотя бы один из компонентов питательной среды или вся она не могут ни поступать в систему, ни покидать ее.

**Поверхностное культивирование** – выращивание микроорганизмов на плотных неагаризованных средах (семенах злаковых растений, отрубях и др.) или на стандартных агаризованных или жидких питательных средах. При этом рост культуры происходит на поверхности питательной среды, где и формируются колонии.

**Псевдопаренхиматозный (ложнотканевой) тип структуры** – тип структуры тела водорослей, характеризуется образованием крупных объемных многоклеточных слоевищ в результате срастания нитей разветвленного разноритчатого слоевища, нередко сопровождаемого морфофункциональной дифференциацией «тканей». Поскольку последние по способу образования отличаются от настоящих, их называют *ложными тканями*.

**Разноритчатый (гетеротрихальный) тип структуры** – тип структуры тела водорослей, который возник на базе нитчатого вследствие морфологической дифференциации различных многоклеточных его участков в связи с приспособлением их к выполнению разных функций: прикрепительной, опорной, ассимиляционной, воспроизводительной и пр. Разноритчатое слоевище состоит большей частью из горизонтальных, стелящихся по субстрату нитей, выполняющих функцию прикрепления, и вертикальных, поднимающихся над субстратом нитей, выполняющих ассимиляционную функцию. Свойственен синезеленым, зеленым, золотистым, красным и бурым водорослям.

**Режимы сбраживания** – температурные режимы (психрофильный, мезофильный и термофильный), обеспечивающие наиболее благоприят-

ные условия для жизнедеятельности, соответственно, психрофилов, мезофилов или термофилов.

**Рекомбинантная ДНК** – молекула ДНК, созданная *in vitro* методами генетической инженерии. Рекомбинантный белок – белок, кодируемый клонированной рекомбинантной ДНК. На сегодняшний день осуществлено молекулярное клонирование более 500 генов различных белков человека, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов. Для ее получения используются как бактериальные системы экспрессии, так и клетки эукариот.

**Рестриктазы, рестрикционные эндонуклеазы** – ферменты, специфически гидролизующие молекулы двухцепочечных ДНК в определенных сайтах рестрикции. Первая Р. (EcoK) была выделена в 1968 г. М. Мезельсоном и Р. Юанем из бактерий штамма *E. coli* K12. На основании характера расщепления молекул ДНК и потребности фермента в кофакторах Р. подразделяют на три класса. Основным инструментом генетической инженерии являются Р. класса II. Ряд Р. этого класса расщепляет молекулы ДНК с образованием выступающих взаимокomплементарных одноцепочечных участков – «липких» концов (напр., BamHI, PstI, EcoRI и др.). Другие Р. расщепляют молекулы ДНК строго по оси симметрии узнаваемой последовательности, что приводит к образованию фрагментов ДНК с «тупыми концами», не имеющими выступающих одноцепочечных участков (напр., SmaI, HaeIII).

**Регенерация** – восстановление целостного организма из клетки, ткани, органа.

**Ризогенез** – процесс заложения, роста и развития корней.

**Ростовой цикл** – рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризуется S-образной кривой. Фазы ростового цикла: латентная, экспоненциальная, замедления роста, стационарная, деградации.

**Рост микроорганизмов** – увеличение числа клеток микроорганизмов путем бинарного деления или почкования. У некоторых микроорганизмов увеличение их числа может происходить вследствие почкования.

**Сифональный тип структуры** – тип структуры тела водорослей, характеризующийся при наличии большого количества органелл отсутствием перегородок внутри слоевища, достигающего сравнительно крупных, обычно макроскопических размеров и определенной степени дифференцировки.

**Сифонокладальный тип структуры** – тип структуры тела водорослей, основным признаком которого является способность к образованию из первичного неклеточного слоевища в результате сегрегативного

деления сложно устроенных слоевищ, состоящих из первично много-ядерных сегментов. Сифонокладальный тип структуры известен лишь у зеленых водорослей.

**Склероции** (от греч. *sklēroîēs* – твердость) – плотные переплетения мицелия, служащие для перенесения неблагоприятных условий (могут быть дифференцированы на кору (темноокрашенную) и внутреннюю часть – из тонкостенных светлоокрашенных клеток).

**Стерилизация** (от лат. *sterilis* – бесплодный) – система мероприятий, направленных на полное уничтожение как вегетативных клеток, так и спор микроорганизмов на поверхности и внутри стерилизуемого объекта. Выделяют термическую С. и холодную С. Стерильность – отсутствие микроорганизмов или других контаминирующих объектов в среде или биологическом объекте.

**Субкультивирование, пассирование** – поддержание клеток в культуре путем переноса части клеток в свежую питательную среду. Субкультивирование животных клеток – перенос части монослойной культуры клеток животных во второй культуральный сосуд после диссоциации клеток монослоя трипсином, суспендирования в среде и определения числа клеток; в случае суспензионной культуры – разведение суспензии клеток свежей средой.

**Стволовые клетки** – митотически активные стволовые клетки, в результате деления которых происходит замещение погибших клеток в многоклеточном организме.

**Субстрат** – вещество, превращение которого катализируется специфическим ферментом.

**Технология рекомбинантных ДНК** – совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала из одного организма в другой.

**Тотипотентность** – свойство клеток растений полностью реализовать свою наследственную программу онтогенетического развития при определенных условиях выращивания вплоть до образования взрослых растений и семян.

**Трансплант** – часть каллусной ткани, используемая для переноса на свежую питательную среду.

**Трансгенные организмы** – организмы, в наследственные структуры которых искусственно введен хотя бы один активно функционирующий ген от другого организма.

**Ферментер, биореактор** – аппарат для осуществления различного рода ферментных реакций в стерильных условиях и при заданных параметрах среды (температура, аэрация, состав среды и др.) при участии микроорганизмов, культур клеток или изолированных ферментов. Ф.

представляет собой закрытый сосуд, изготовленный из термостойкого боросиликатного стекла или металла, оборудованный устройствами для измерения и регулирования температуры и pH среды, системой перемешивания.

**Ферменты иммобилизованные** (от лат. *immobilis* – неподвижный) – ферменты, молекулы которых связаны с матрицей или носителем (как правило, полимером), сохраняя при этом полностью или частично свои каталитические свойства. Выделяют физические методы иммобилизации (без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем) и химические методы иммобилизации, предполагающие образование таких связей.

**Фитогормоны** – (гормоны растений) – биологически активные соединения, образующиеся в растениях в малых количествах, вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект.

**Фильтрование** – разделение твердой и жидкой фаз суспензии при пропускании ее через пористую перегородку.

**Флокулянты** – вещества, способствующие разрушению коллоидных структур и образованию крупных хлопьев.

**Фототрофы (фотоавтотрофы, гелиотрофы)** – микроорганизмы, способные ассимилировать углекислоту за счет использования солнечной энергии.

**Целевой продукт** – вещество, синтез которого осуществляется в промышленных масштабах с помощью биотехнологических объектов. В качестве Ц. п. можно рассматривать очищенные сточные воды с территорий промышленных предприятий и населенных мест, а также почву после биоремедиации.

**Цикл выращивания** – период от помещения инокулюма или трансплантата в свежую среду до последующего субкультивирования.

**Цитокинины** – фитогормоны (кинетин, 6-БАП), активизирующие развитие меристем, стимулирующие образование почек.

**Ультрафильтрация** – разделение клеток и молекул с использованием мембран с диаметром пор от 0,001 до 0,1 мкм.

**Упаривание** – процесс концентрирования жидких растворов путем частичного удаления растворителя испарением при нагревании жидкости.

**Устойчивые клеточные линии** – культуры клеток, способные к неограниченному росту *in vitro*. Получаются из перевиваемых клеточных культур, часть клеток которых приобретают селективные преимущества и обладают повышенной скоростью роста.

**Хемостатная (открытая) система культивирования** – это система культивирования микроорганизмов, когда все питательные компоненты могут поступать в реактор, в котором выращивается тот или иной орга-

низм, и удаляться из реактора в виде продуктов синтеза микроорганизмов (антибиотики, витамины, ферменты и т.д.) или биомассы самих микроорганизмов.

**Целлюлозоразлагающие бактерии** – микробы, подвергающие клетчатку превращению в аэробных и анаэробных условиях. Анаэробное разложение (брожение) осуществляют возбудители водородного (*Bac. cellulosaе hydrogenicus*) и метанового (*Bac. cellulosaе metanicus*) брожения клетчатки. Аэробное окисление клетчатки осуществляют микроорганизмы родов *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicuba*.

**Центрифугирование** – разделение неоднородных систем под воздействием поля центробежных сил.

**Цикл выращивания** – период от помещения инокулюма или трансплантата в свежую среду до последующего субкультивирования.

**Штамм** – культура, возникшая после первого субкультивирования. Состоит из многих клеточных линий, возникших из клеток, присутствующих в первичной культуре.

**Экстракция** – процесс разделения смеси твердых и жидких веществ с помощью избирательных растворителей (экстрагентов).

**Эукариоты** – организмы, у которых: 1) имеется ядро, где содержатся хромосомы; 2) в цитоплазме присутствуют различные органеллы – митохондрии, хлоропласты и т.д. К эукариотам относятся животные, растения, грибы, некоторые водоросли.

**Эксплант** – фрагмент ткани или органа, инкубируемый самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

**In vitro** – выращивание живого материала «в стекле», на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

**In vivo** – выращивание живого материала в естественных условиях.

