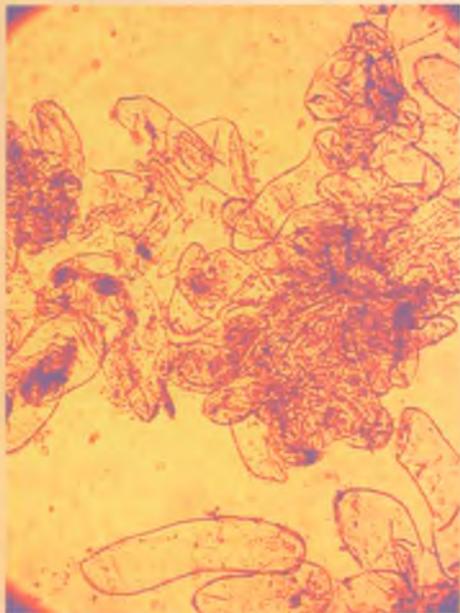


57

Б63

Н.В. ЗАГОСКИНА
Л.В. НАЗАРЕНКО
Е.А. КАЛАШНИКОВА
Е.А. ЖИВУХИНА

БИОТЕХНОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА



01
Б63
43

Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко,
Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина

БИОТЕХНОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Под редакцией
Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко

Учебное пособие

Допущено
Учебно-методическим советом по биологии
Учебно-методического объединения
по классическому университетскому образованию
в качестве учебного пособия для студентов высших
учебных заведений, обучающихся
по специальности 020201 «Биология»



МОСКВА
ОНИКС

549.6(075.8)

УДК 631.147

ББК 30.16

Б63

Издано при финансовой поддержке
Федерального агентства по печати и массовым коммуникациям
в рамках Федеральной целевой программы «Культура России»

Рецензенты:

заместитель директора по научной работе Института общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН доктор биологических наук, доцент
И.В. Голденкова-Павлова;
заведующий кафедрой органической и биологической химии
Московского государственного областного университета
доктор биологических наук, профессор
А.С. Коничев

Загоскина Н.В.

Б63 Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для
вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова,
Е.А. Живухина; Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. —
М.: Издательство Оникс, 2009. — 496 с., 8 с. цв. вкл.: ил.

ISBN 978-5-488-02173-0

Учебное пособие соответствует требованиям Государственного образовательного стандарта по специальности «Биология». В свете современных представлений о биотехнологии как важнейшем научном направлении и отрасли промышленности изложены основы клеточной, тканевой, генетической и энзиматической инженерии, промышленной биотехнологии. Особое внимание уделено нанобиотехнологии, экологической биотехнологии, криосохранению, а также вопросам биобезопасности и государственного регулирования генно-инженерной деятельности.

Наряду с изложением теоретических основ курса книга включает в себя лабораторный практикум по биотехнологии, что выгодно отличает ее от аналогичных учебных изданий.

Предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлениям и специальностям биологического, агрономического, биотехнологического и медицинского образования, а также для аспирантов, научных сотрудников и слушателей ФПК.

603410

УДК 631.147

ББК 30.16

ISBN 978-5-488-02173-0

Торайырда
атындагы ПМУ
академик С.Бейсембаев
атындагы университеті

КІТАПЖАНАСЫ

© Коллектив авторов, 2009

© ООО «Издательство Оникс», 2009

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	6
Глава 1. Общие представления о биотехнологии.	9
1.1. Основные этапы развития биотехнологии	10
1.2. Технологии и биотехнологии	15
1.3. Основные направления развития биотехнологии	17
1.4. Задачи биотехнологии	23
1.5. Биотехнологические основы высоких технологий	25
Глава 2. Основные объекты биотехнологии и их народнохозяйственное значение.	30
2.1. Вирусы	31
2.2. Бактерии.	34
2.3. Водоросли	39
2.4. Лишайники	49
2.5. Грибы	52
2.6. Водные растения	56
2.7. Высшие растения <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	57
2.8. Животные <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	62
Глава 3. Клеточная и тканевая инженерия растений.	65
3.1. История развития метода клеточной и тканевой инженерии растений	66
3.2. Основные направления клеточной инженерии растений	69
3.3. Клетка как основа жизни биологических объектов	71
3.4. Дедифференциация — основа формирования клеточных культур растений.	78
3.5. Каллусные культуры растений	79
3.6. Суспензионные культуры растений.	86
3.7. Изолированные протопласты	89
3.8. Морфогенез в клеточных культурах растений	92
3.9. Клональное микроразмножение растений и его практическое применение.	99
3.10. Методы клеточной инженерии растений в ускорении селекционного процесса	110
Глава 4. Генетическая инженерия	123
4.1. Молекулярные основы генетической инженерии	123
4.2. Основные этапы создания трансгенных организмов	151
4.3. Генетическая инженерия прокариот	153

4.4. Генетическая инженерия растений	155
4.5. Генетическая инженерия животных	176
4.6. Генодиагностика и генотерапия человека	189
<i>Глава 5. Коллекции и криобанки клеточных культур</i>	<i>196</i>
5.1. Сохранение организмов и клеточных культур	196
5.2. Криосохранение и его основы	199
5.3. Криобанки	209
<i>Глава 6. Основы промышленной биотехнологии и получение первичных и вторичных метаболитов</i>	<i>213</i>
6.1. Основные методы и подходы, используемые в промышленной биотехнологии	214
6.2. Технологическое оборудование промышленного назначения	220
6.3. Продукты биотехнологии и блок-схемы их производств	226
6.4. Белковые продукты	229
6.5. Аминокислоты	234
6.6. Гормоны	238
6.7. Инсулин	242
6.8. Витамины	245
6.9. Интерфероны	250
6.10. Вакцины	255
6.11. Антибиотики	259
6.12. Моноклональные антитела	270
6.13. Вторичные соединения	275
<i>Глава 7. Энзиматическая инженерия</i>	<i>295</i>
7.1. Роль и значение ферментов	295
7.2. Имобилизованные ферменты	298
7.3. Имобилизованные полиферментные системы	303
7.4. Биосенсоры	304
7.5. Биочипы	311
<i>Глава 8. Экологическая биотехнология</i>	<i>320</i>
8.1. Биотехнология утилизации твердых отходов	320
8.2. Биотехнология очистки сточных вод	325
8.3. Биоочистка газовоздушных выбросов	334
8.4. Биогеотехнология и получение металлов	342
8.5. Биоэнергетика	350
8.6. Ксенобиотики и их биодegradация	360
8.7. Биоремедиация	367
<i>Глава 9. Нанобиотехнологии</i>	<i>371</i>
9.1. Представления о нанотехнологиях	371
9.2. Нанотехнологии в медицине и биологии	373
9.3. Основные направления развития нанобиотехнологии.	381
9.4. Возможные риски, связанные с использованием нанобиотехнологий	382

Глава 10. Биобезопасность и государственный контроль ..	385
10.1. Введение	385
10.2. Международная законодательная база по биобезопасности и ее реализация	388
10.3. Законодательная база России по биобезопасности и ее реализация	390
<i>Приложения</i>	
Лабораторный практикум	399
Исторические вехи развития биотехнологии.	438
Словарь основных терминов по биотехнологии	472
Литература	487

ПРЕДИСЛОВИЕ

Биотехнология как наука возникла в 1950-х гг. и в настоящее время является одним из приоритетных научных направлений. Именно с достижениями в области биотехнологии связывают не только повышение благосостояния человечества в будущем, но и увеличение продолжительности жизни людей.

Быстрое развитие биотехнологии обусловлено интенсивным развитием биологии, успехами в познании жизненных явлений, прежде всего в области микробиологии, энзимологии, молекулярной биологии и молекулярной генетики. Все это позволило объединить разрозненные прикладные направления в новую единую фундаментальную науку о практическом использовании биологии в целом (а не отдельных ее ветвей, как это было прежде) — *биотехнологию*.

Биотехнология — это и технологические процессы, осуществляемые с использованием различных биологических систем, включая как живые организмы (от микроорганизмов до клеток животных и растений), так и их компоненты (ферменты, витамины и т. д.).

Микроорганизмы стали основой для производства целого ряда полезных продуктов (органических кислот, этанола для технических целей, ферментов, витаминов, антибиотиков и т. п.). Культивируемые в условиях *in vitro* растительные и животные клетки нашли применение в сельском хозяйстве (растениеводстве, животноводстве), при получении физиологически активных веществ, фармацевтических препаратов, моноклональных антител и других продуктов.

В биологической промышленности используются разнообразные биомолекулы, а также иммобилизованные ферменты, что позволило решить часть технологических проблем.

Важное направление современной биотехнологии — генетическая инженерия. Она предоставила исследователям новую, исключительно ценную возможность изменения генетической программы бактериальных, растительных и животных клеток. И это направление исследований уже приносит большие научные и практические результаты.

Нет сомнений, что биотехнология является одним из важных направлений научно-технического прогресса. Она внесет (и уже внесла) большой вклад в обеспечение растущего населения Земли продовольствием, благодаря ее достижениям принципиально улучшится состояние медицины и ветеринарии, в постнефтяную и постгазовую эры будут созданы новые виды топлива, а также сырьевая база и технологии переработки возобновляемого сырья для химической индустрии. Несомненен значительный вклад биотехнологии в защиту окружающей среды.

Биотехнология — одна из перспективных и высококорентабельных отраслей производства. Например, в США насчитывается более 1500 биотехнологических компаний (во всем мире их свыше 3 тыс.), в числе которых крупнейшие химические и фармацевтические концерны Monsanto, Du Pont, American Cyanamid, Merck, Novartis и др. В других странах, где инвестиционный климат не столь благоприятен и бизнес менее активен, главную роль в создании биотехнологических предприятий играют крупные корпорации и государство. Быстро развивается и западноевропейская биотехнологическая индустрия, в которой занято свыше 600 биотехнологических компаний.

В России также уделяется значительное внимание развитию биотехнологии. Уже имеются биотехнологические разработки мирового уровня, внедрение которых приносит ощутимую пользу обществу. Так, уникальная микробиологическая технология регулирования микрофлоры пластов, разработанная в Институте микробиологии РАН, позволила компании «Татнефть» получить дополнительно около полу-миллиона тонн «черного золота».

Извлечение металлов из руды с помощью микробного окисления и последующего электролиза не только дает возможность использовать «бедное» сырье, но и позволяет ог-

раничить выброс в атмосферу вредных серосодержащих газов, образующихся в процессе обжига руды при традиционной технологии.

По новой технологии Института микробиологии РАН с 2001 г. в Красноярском крае на золотодобывающем комбинате работает восемь ферментеров.

Создан новый способ снижения концентрации метана в шахтах с использованием метанотрофных бактерий.

Разработаны и производятся флокулянты для фильтрации воды в очистных сооружениях, созданы оригинальные технологии производства ферментов для стиральных порошков (Гос. НИИ Генетика РАН).

Достижения биотехнологии приносят реальную пользу народному хозяйству и людям, когда на их основе открываются промышленные производства, создающие в значительных количествах практически ценные продукты, что и является основной задачей биотехнологов.

При подготовке настоящего учебника авторы ставили перед собой цель раскрыть основные представления о биотехнологии, ее направлениях, этапах развития и областях применения, а также охарактеризовать достижения биотехнологии как науки и как отрасли промышленности.

Глава 1

ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОТЕХНОЛОГИИ

В современном понимании биотехнология — это наука о технологиях создания и использования биологических объектов, способствующих интенсификации производства или получению новых видов продуктов различного назначения на основе методов клеточной и генетической инженерии.

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

Человек использовал биотехнологические процессы еще многие тысячи лет назад: люди занимались пивоварением, пекали хлеб; они придумали способы хранения и переработки продуктов путем ферментации (производство сыра, уксуса, соевого соуса), научились делать мыло из жиров, изготавливать простейшие лекарства и перерабатывать отходы.

Однако только разработка новых методов, являющихся основой биотехнологических процессов, позволила улучшить уже имеющиеся процессы и продукты, а также создавать оригинальные способы получения новых, ранее недоступных веществ и осуществлять новые процессы.

Применение научных достижений в биотехнологии тесно связано с фундаментальными исследованиями и осуществляется на самом высоком уровне современной науки, в том числе химии, физики, генетики, биохимии, микробиологии и др.

В наши дни определилась еще одна важная особенность развития отдельных перспективных разделов биотехноло-

гии — необходимость тесного международного сотрудничества специалистов, ученых и технологов. Ярким примером тому служит интернациональность ряда основанных в последние годы крупнейших международных биотехнологических фирм.

1.1. Основные этапы развития биотехнологии

Для обозначения наиболее тесно связанных с биологией разнообразных технологий раньше использовали такие наименования, как «прикладная микробиология», «прикладная биохимия», «технология ферментов», «биоинженерия», «прикладная генетика», «прикладная биология».

Наши предки в течение тысячелетий успешно использовали метод микробиологической ферментации для сохранения и улучшения вкуса пищи, производства спиртных напитков. Так, пивоварение до сих пор остается наиболее важной (в денежном исчислении) отраслью биотехнологии: в мире ежегодно производится свыше 10^{11} л пива на сумму порядка 175 млн долларов. В основе процесса пивоварения лежат реакции обмена веществ, происходящие при росте и размножении некоторых микроорганизмов в анаэробных условиях.

Благодаря трудам Л. Пастера в конце XIX в. были созданы условия для дальнейшего развития прикладной (технической) микробиологии, а также в значительной мере и биотехнологии. Пастер установил, что микроорганизмы играют ключевую роль в процессах брожения, и показал, что в образовании отдельных продуктов участвуют разные их виды. Это послужило основой развития в конце XIX — начале XX в. бродильного производства органических растворителей (ацетона, этанола, бутанола, изопропанола) и других химических веществ, где использовались разнообразные виды микроорганизмов.

Процессы, в которых биомасса, т. е. возобновляемый источник сырья, используется для получения химических веществ, играли ведущую роль на первом этапе развития современной биотехнологии. По мере становления нефтехимии на смену многим из них пришли химические процессы.

В тех случаях, когда некоторые химические соединения (например, цитрат, ацетат и итаконат) широко применяли при производстве пищевых продуктов, их продолжали получать и путем брожения — самым выгодным с экономической точки зрения. В некоторых странах (например, в Италии) таким способом вырабатывали даже технический этиловый спирт. Сегодня под влиянием энергетического кризиса производство спирта из растительного сырья получает все более широкое распространение в США, Бразилии и других странах.

Следующим важным этапом в развитии биотехнологии хозяйственно ценных веществ была организация промышленного производства антибиотиков, основой которого стало открытие в 1940 г. А. Флемингом, Х. Флори и Э. Чейном химиотерапевтической активности пенициллина. Сегодня годовая оборот этой отрасли составляет около 3,5 млрд долларов.

Как получение химических соединений и пищевых добавок путем брожения, так и синтез антибиотиков всегда велись в асептических условиях, но некоторые современные процессы (например, образование белка одноклеточными организмами) осуществляют в еще более жестком режиме. Обеспечение таких особых условий — многоплановая задача, и она решается инженерами-химиками и микробиологами.

Вместе с тем переработка отходов, например, не требует стерильных условий; напротив, чем больше разных микроорганизмов принимает участие в процессе, тем лучше. В наше время все более широко применяют переработку стоков в анаэробных условиях смешанной микрофлорой, в результате чего попутно образуется биогаз (он состоит в основном из метана и CO_2). Этот способ энергетически высокоэффективен, позволяет сохранять и концентрировать энергию, содержащуюся в различных компонентах стоков (с газом регенерируется более 80 % свободной энергии), а в сельской местности с его помощью можно получать значительную часть столь необходимой энергии. Так, в Китае построено более 18 млн генераторов биогаза. В развитых странах с высоким потреблением энергии превращение отходов

в биогаз может покрыть лишь несколько процентов их энергетических потребностей. На отдельных крупных заводах по переработке отходов биогаз часто сжигают в тепловых машинах, которые приводят в действие электрогенераторы. В последние годы созданы также небольшие установки, предназначенные для переработки отходов сельского хозяйства.

Таблица 1

**Направления биотехнологии и получаемые
с ее помощью продукты**

Отрасль	Примеры
Сельское хозяйство	Получение новых штаммов; новые методы селекции растений и животных (включая клонирование)
Производство химических веществ	Получение органических кислот (например, лимонной, итаконовой); использование ферментов в составе моющих средств
Энергетика	Увеличение потребления биогаза; крупномасштабное производство этанола как жидкого топлива
Контроль за состоянием окружающей среды	Совершенствование методов тестирования и мониторинга; прогнозирование превращений ксенобитиков; улучшение методов переработки отходов, особенно промышленных
Пищевая промышленность	Создание новых методов переработки и хранения пищевых продуктов; получение пищевых добавок; использование белка, синтезируемого одноклеточными организмами; получение ферментов для переработки пищевого сырья
Материаловедение	Выщелачивание руд; контроль биоразложения

Отрасль	Примеры
Медицина	Применение ферментов для усовершенствования диагностики; создание датчиков на основе ферментов; использование микроорганизмов и ферментов при производстве сложных лекарств (например, стероидов); синтез новых антибиотиков; применение ферментов в терапии

Широкое распространение получило производство аминокислот в аэробных микробиологических процессах. В основном это глутамат натрия (ежегодное производство в мире — около 150 тыс. т), который является усилителем вкуса, и лизин (ежегодное производство в мире — 15 тыс. т), который служит пищевой добавкой. За год в мире продается аминокислот на сумму 1,75 млрд долларов, причем большую часть поставляют японские фирмы.

В промышленных масштабах уже в течение многих десятилетий используется способность микроорганизмов преобразовывать растительную биомассу с низким содержанием белка в пищевые продукты с высоким его содержанием. В Германии в период Первой мировой войны выращивали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые добавляли в колбасу и супы, что компенсировало около 60 % довоенного импорта пищевых продуктов. Во время Второй мировой войны осуществляли сходные процессы, но уже на основе пищевых дрожжей *Candida arborea* и *Candida utilis*.

В 1960-х гг. некоторые нефтяные и химические компании начали проводить исследования с целью получения из одноклеточных организмов белка, предназначенного для добавления в пищу людям и животным. В какой-то мере это было связано с недостатком белковой пищи в мире. В качестве субстратов использовали нефть, метан, метанол и крахмал. Наиболее конкурентоспособными оказались процессы на основе метанола и крахмала. Основная масса

полученных продуктов предназначалась для добавления в корм животным.

В западных странах компанией ICI был построен самый крупный завод, где в одном ферментере при участии метанолпотребляющей бактерии *Methylophilus methylotrophus* из метанола получают около 70 тыс. т белка прутина (Pruteen) в год. Модификация механизмов ассимиляции азота этими бактериями, достигнутая с помощью технологии рекомбинантных ДНК, привела к еще большему увеличению выхода продукта. Это стало одним из первых доказательств практической значимости и потенциальных возможностей генетической инженерии.

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

Возрастает интерес к применению ферментов в медицинской промышленности (главным образом для диагностики), хотя в целом их использование остается сравнительно небольшим. Это обусловлено нестабильностью ферментов, сложностью выделения продуктов переработки и проблемами, связанными с добавлением или заменой кофакторов.

Однако в некоторых случаях эти сложности удается обойти путем использования интактных (целых) клеток микроорганизмов. Такой способ применили при крупномасштабном производстве лекарственных препаратов стероидной природы. Было установлено, что многие микроорганизмы способны строго направленно и стереоспецифически гидроксिलировать сложные молекулы стероидов. Например, плесневый гриб *Rhizopus arrhizus* способен стереоспецифически (по 11-му положению) гидроксिलировать женский половой гормон прогестерон.

Существенно упростилось производство кортизона, который применяют для лечения артрита. До внедрения нового способа данное соединение получали с помощью химического синтеза, включавшего 37 стадий; при этом выход вещества составлял 0,02 %, а стоимость 1 г достигала 200 долларов. Благодаря введению в процесс получения кортизона этапа биотрансформации, синтез стал проще, а цена препарата составила 68 центов за 1 г.

Впоследствии был обнаружен еще ряд микроорганизмов, способных специфически гидроксिलировать другие углеродные атомы стероидного кольца. Микробные системы сейчас используют для превращения фитостероидов в С-19-стероидные гормоны с менее громоздкими молекулами. Они находят широкое применение, в частности как пероральные противозачаточные средства.

Освоение методов культивирования растительных и животных клеток в большом объеме повысило эффективность получения вакцин. Разработка метода слияния клеток различных линий позволила получить новые клоны масличных пальм, не только более урожайные, но и дающие продукцию более высокого качества.

1.2. Технологии и биотехнологии

Технология — это способы и приемы, используемые для получения из исходного материала (сырья) некоторого продукта. Очень часто для получения одного продукта требуется не один, а несколько источников сырья, не один способ или прием, а последовательность нескольких. Все многообразие технологий можно подразделить на три основных класса:

- физико-механические технологии;
- химические технологии;
- биотехнологии.

В *физико-механических технологиях* исходный материал (сырье) в процессе получения продукта меняет форму или агрегатное состояние без изменения своего химического состава (например, технология переработки древесины для производства деревянной мебели, различные методы получения металлических изделий: гвоздей, деталей машин и др.).

В *химических технологиях* в процессе получения продукта сырье претерпевает изменения химического состава (например, получение полиэтилена из природного газа, спирта — из природного газа или древесины, синтетического каучука — из природного газа).

Биотехнология — это целенаправленное получение ценных для народного хозяйства и человека продуктов за счет

биохимической деятельности микроорганизмов, изолированных клеток или их компонентов.

Следовательно, биотехнология предполагает использование таких культур бактерий, клеток животных и растений, метаболизм и биологические возможности которых обеспечивают выработку специфических веществ. Например, в фармацевтической промышленности она охватывает разработку вакцин, синтез гормонов, ферментов, интерферонов, антибиотиков, аминокислот, витаминов, алкалоидов, полисахаридов и других биологически активных веществ (БАВ).

Цель биотехнологических исследований — повышение эффективности производства и поиск биологических систем, с помощью которых можно получить целевой продукт. Однако при использовании природных микробных штаммов выход конечного продукта часто оказывается существенно ниже оптимального.

Возможности биотехнологии значительно изменились с развитием технологии рекомбинантных ДНК. В 1973 г. американские ученые С. Коэн и Г. Бойер разработали стратегию переноса гена из одного организма в другой. Стало возможным не просто отбирать высокопродуктивные штаммы микроорганизмов и эукариотических клеток, но и создавать принципиально новые виды, используя их в качестве «биологических фабрик» по производству различных продуктов: инсулина, интерферонов, интерлейкинов, гормона роста, вирусных антигенов и множества других белков. Это быстродействующий, эффективный, мощный инструмент, обеспечивающий создание организмов с заранее заданными генетическими характеристиками. Технология рекомбинантных ДНК позволяет получать в промышленных масштабах ценные низкомолекулярные вещества и макромолекулы, которые в естественных условиях образуются в минимальных количествах.

Биотехнология дает возможность воспроизводить нужные продукты в неограниченных количествах, применяя новые технологии, позволяющие переносить гены в клетки-продуценты или в целый организм (трансгенные животные и растения), синтезировать пептиды, создавать искусственные вакцины.



Рис. 1.1. Научные основы и продукты биотехнологии (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002)

Все эти основные биотехнологические процессы реализуются на уровне клетки или с участием отдельных клеточных структур. В промышленном масштабе биотехнология представляет собой биоиндустрию (рис. 1.1).

1.3. Основные направления развития биотехнологии

Расширение сфер применения биотехнологии существенно влияет на повышение уровня жизни человека (рис. 1.2). Быстрее всего внедрение биотехнологических процессов дает результаты в медицине, но, по мнению многих специалистов, основной экономический эффект будет получен в сельском хозяйстве и химической промышленности.

Микрочипы, клеточные культуры, моноклональные антитела и белковая инженерия — это лишь небольшая часть современных биотехнологических приемов, используемых на разных стадиях разработки многих видов продукции. Понимание молекулярных основ биологических процессов дает возможность значительно сократить затраты на разработку и подготовку производства определенного продукта, а также повысить его качество. Например, сельскохозяйственные

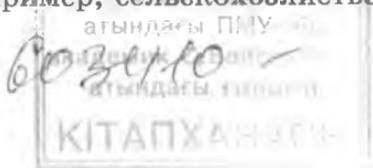




Рис. 1.2. Использование достижений биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства (по Д. Тейлор и др., 2002)

биотехнологические компании, создающие устойчивые к насекомым сорта растений, могут измерять количество защитного белка в клеточной культуре и не тратить ресурсы на выращивание самих растений; фармакологические компании могут использовать клеточные культуры и микрочипы для проверки безопасности и эффективности препаратов, а также для выявления возможных побочных эффектов на ранних стадиях получения лекарственных средств.

Генетически модифицированные животные, в организмах которых происходят процессы, отражающие физиологию различных человеческих заболеваний, обеспечивают ученых вполне адекватными моделями для проверки действия того или иного вещества на организм. Это также позволяет компаниям выявлять наиболее безопасные и эффективные препараты на более ранних стадиях разработки.

Применение биотехнологических приемов может повысить прибыльность производства и за счет сокращения процесса получения продукта. Так, небольшой фрагмент ДНК, используемый учеными исследовательской лаборатории для установления локализации гена в геноме паразита растения, впоследствии может выступить в качестве компонента диагностического набора, выявляющего наличие данного патогена, а моноклональные антитела, синтезированные для идентификации терапевтического белкового агента, в дальнейшем можно использовать для выделения и очистки искомого соединения.

Все это свидетельствует о важном значении биотехнологии и широких возможностях ее применения в различных отраслях народного хозяйства. Какие же направления являются наиболее приоритетными в этой области? Рассмотрим их.

1. Повышение безопасности биотехнологического производства для человека и окружающей среды. Требуется создание таких рабочих систем, которые будут функционировать только в строго контролируемых условиях. Например, штаммы кишечной палочки, используемые в биотехнологии, лишены надмембранных структур (оболочек); такие бактерии просто не могут существовать вне лабора-

торий или вне специальных технологических установок. Повышенной безопасностью обладают и многокомпонентные системы, каждая из которых не способна к самостоятельному существованию.

2. Снижение доли отходов производственной деятельности человека. Отходами производства называются его побочные продукты, которые не могут использоваться человеком или другими компонентами биосферы и применение которых нерентабельно или сопряжено с каким-то риском. Такие отходы накапливаются в пределах производственных помещений (территорий) или выбрасываются в окружающую среду. Следует стремиться к изменению соотношения «полезный продукт/отходы» в пользу полезного продукта. Этого достигают различными способами. Во-первых, отходам необходимо найти полезное применение. Во-вторых, их можно направить на вторичную переработку, создав замкнутый технологический цикл. И наконец, можно изменить саму рабочую систему так, чтобы уменьшить долю отходов.

3. Снижение энергетических затрат на производство продукта, т. е. внедрение энергосберегающих технологий. Принципиальное решение этой проблемы возможно в первую очередь за счет использования возобновляемых источников энергии. Например, годовое потребление энергии ископаемого топлива соизмеримо с объемом чистой валовой продукции всех фотосинтезирующих организмов на Земле. Для трансформации солнечной энергии в формы, доступные для современных силовых установок, создаются (в том числе методами клеточной инженерии) *энергетические плантации* быстрорастущих растений. Полученная биомасса используется для производства целлюлозы, биотоплива, а также биогаза. Всесторонние выгоды подобных технологий очевидны. Использование методов клеточной инженерии для постоянного обновления посадочного материала обеспечивает получение в кратчайшие сроки большого количества растений, свободных от вирусов и микоплазм; при этом отпадает необходимость создания маточных плантаций. Снижается нагрузка на естественные насаждения древесных растений (в значительной мере они вырубались для получения целлюлозы и топлива), уменьшаются потребнос-

ти в ископаемом топливе (в общем-то, оно является экологически неблагоприятным, поскольку при его сжигании образуются недоокисленные вещества). При использовании биотоплива образуются углекислый газ и водяные пары, которые поступают в атмосферу, а затем вновь связываются растениями на энергетических плантациях.

4. Создание многокомпонентных растительных систем. Качество сельскохозяйственной продукции значительно ухудшается при применении минеральных удобрений и ядохимикатов, которые наносят колоссальный ущерб природным экосистемам. Преодолеть негативные последствия химизации сельскохозяйственного производства можно различными способами. Прежде всего необходимо отказаться от монокультур, т. е. от использования ограниченного набора биотипов (сортов, пород, штаммов). Недостатки монокультуры были выявлены еще в конце XIX столетия; они очевидны. Во-первых, в монокультуре возрастают конкурентные отношения между выращиваемыми организмами; в то же время монокультура оказывает лишь одностороннее воздействие на конкурирующие организмы (сорняки). Во-вторых, происходит избирательный вынос элементов минерального питания, что ведет к деградации почв. И наконец, монокультура неустойчива к патогенам и вредителям. Поэтому в течение XX в. она поддерживалась за счет исключительно высокой интенсивности производства. Разумеется, использование монокультур интенсивных сортов (пород, штаммов) упрощает разработку технологии производства продукции. Например, с помощью высоких технологий созданы сорта растений, устойчивые к определенному пестициду, который при возделывании именно данных сортов можно применять в высоких дозах. Однако в этом случае возникает вопрос безопасности такой рабочей системы для человека и окружающей среды. Кроме того, рано или поздно появятся расы патогенов (вредителей), устойчивые к данному пестициду.

Следовательно, необходим планомерный переход от монокультуры к многокомпонентным (поликлональным) композициям, включающим разные биотипы культивируемых организмов. Многокомпонентные композиции должны вклю-

чать организмы с разным ритмом развития, с различным отношением к динамике физико-химических факторов среды, к конкурентам, патогенам и вредителям. В генетически гетерогенных системах возникают компенсаторные взаимодействия особей с различными генотипами, снижающие уровень внутривидовой конкуренции и автоматически увеличивающие давление культивируемых организмов на конкурирующие организмы других видов (сорняки). По отношению к патогенам и вредителям такая гетерогенная экосистема характеризуется *коллективным групповым иммунитетом*, который определяется взаимодействием множества структурных и функциональных особенностей отдельных биотипов.

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

Целевые препараты. Основными причинами онкологических заболеваний являются неконтролируемое деление клеток и нарушение процессов апоптоза. Действие препаратов, предназначенных для их устранения, может быть направлено на любую из молекул или клеточных структур, участвующих в этих процессах. Исследования, проведенные в области функциональной геномики, уже предоставили нам информацию о молекулярных изменениях, происходящих в предраковых клетках. На основе полученных данных можно создавать диагностические тесты для выявления молекулярных маркеров, сигнализирующих о начале онкологического процесса до того, как появляются первые видимые нарушения клеток или проявляются симптомы заболевания.

Большинство химиотерапевтических препаратов воздействует на белки, участвующие в процессе деления клетки. К сожалению, при этом погибают не только злокачественные клетки, но часто и нормальные делящиеся клетки организма, такие, как клетки системы кроветворения и волосяных фолликулов. Чтобы предупредить появление этого побочного эффекта, некоторые компании начали разработку препаратов, которые останавливали бы клеточные циклы

здоровых клеток непосредственно перед введением дозы химиотерапевтического агента.

Индивидуальные препараты. На сегодняшнем этапе развития науки начинается эпоха индивидуализированной медицины, в которой генетические различия пациентов будут учитываться для наиболее эффективного применения лекарств. Используя данные функциональной геномики, можно выявлять генетические варианты, отвечающие за предрасположенность конкретных пациентов к отрицательным побочным эффектам одних препаратов и за восприимчивость — к другим. Такой индивидуальный терапевтический подход, базирующийся на знании генома пациента, получил название **фармакогеномики**.

У разных людей варьируют скорость и характер протекания заболеваний. Некоторые патологические процессы при переходе из одной фазы в другую оставляют после себя «молекулярные отпечатки». Знание таких молекулярных маркеров позволяет врачам определять степень прогрессирования заболевания и подбирать наиболее подходящую терапию. Препараты, предназначенные для лечения ранних стадий процесса, будут неэффективны при прогрессировании заболевания.

Некоторые болезни также характеризуются разной степенью агрессивности. Например, одни типы рака груди гораздо агрессивнее других и требуют иных терапевтических подходов. Идентификация уникальных молекулярных маркеров различных типов рака позволит специалистам подбирать адекватные методы лечения и корректировать их в каждом конкретном случае в зависимости от обстоятельств.

1.4. Задачи биотехнологии

В современной биотехнологии используются биологические системы всех уровней — от молекулярно-генетического до биогеоценотического (биосферного); при этом создаются принципиально новые биологические системы, не встречающиеся в природе. Биологические системы, применяемые в биотехнологии, вместе с небиологическими компонентами (технологическое оборудование, материалы, системы энер-

госнабжения, контроля и управления) удобно называть **рабочими системами**.

Первоочередной задачей, стоящей перед биотехнологией, являются исследования в области разработки и получения:

— новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины (интерферонов, инсулина, гормона роста человека, моноклональных антител и т. д.), повышающих качество жизни людей и позволяющих осуществлять раннюю диагностику и лечение тяжелых заболеваний — сердечно-сосудистых, злокачественных, наследственных, инфекционных, в том числе вирусных;

— микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей;

— бактериальных удобрений и регуляторов роста растений, повышения плодородия почв;

— новых, с заданными свойствами, высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, полученных методами генетической и клеточной инженерии;

— ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, ветеринарных препаратов и др.), необходимых для повышения продуктивности животноводства;

— новых методов биоинженерии для эффективной профилактики, диагностики и терапии основных болезней сельскохозяйственных животных;

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

— технологий глубокой и эффективной переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов; использования сточных вод и газовоздушных выбросов для получения биогаза и высококачественных удобрений; производства дешевых и эффективных энергоносителей (биотоплива).

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

Микробиологическим синтезом называется синтез самых разнообразных веществ с помощью микроорганизмов. В настоящее время микроорганизмы применяют в различных высоких технологиях: для производства антибиотиков, кормового белка и аминокислот, биологически активных соединений (витаминов, гормонов, ферментов, стимуляторов роста) и т. д. Превращение одних веществ в другие с помощью микроорганизмов называется **био конверсией**. При микробиологическом синтезе исходным сырьем служат разнообразные источники углерода (природные углеводороды, органические отходы), минеральные соли и атмосферный азот. В качестве микроорганизмов используют прокариоты (бактерии, актиномицеты) и грибы.

Применяя методы генетической и клеточной инженерии, современная биотехнология осуществляет широкое конструирование генетически модифицированных организмов (ГМО), в том числе микроорганизмов, растений и животных. В дальнейшем предполагается использование ГМО в природных условиях (в сельском хозяйстве, рыбоводстве, для биологической борьбы с вредителями сельского и лесного хозяйства и т. д.). Однако перед генетической инженерией стоит ряд этических и технологических проблем. При выпуске ГМО в окружающую среду они могут взаимодействовать с разнообразными организмами, сообществами и экосистемами конкретных территорий, в то время как процесс и исход таких взаимодействий не всегда поддается прогнозированию. В частности, существует опасность внедрения «искусственных генов» в геном природных организмов в результате скрещивания ГМО и «диких» форм. Из-за возможных непредсказуемых последствий необходимы исследования, направленные на изучение биобезопасности ГМО.

1.5. Биотехнологические основы высоких технологий

Современная биотехнология развивается настолько динамично, что пока невозможно разработать единую классификацию ее компонентов. Лишь в самом грубом приближении (по аналогии с промышленными небиологическими технологиями) можно выделить следующие типы техноло-

гий: технологии низкого и высокого уровня, экстенсивные и интенсивные, безотходные, безопасные, ресурсо- и энергосберегающие, трудоемкие, наукоемкие, прорывные. Современные биотехнологии различных направлений и различных уровней неразрывно связаны между собой в единую научно-производственную систему.

Технологии низкого уровня — это технологии традиционные, в известной мере устаревшие. К таковым относятся технологии биологической очистки сточных вод, получения биотоплива, некоторые виды микробиологического синтеза. Они характеризуются низкой наукоемкостью, т. е. базируются на использовании рабочих систем, полученных методами традиционной селекции. Такие технологии широко используются в традиционном сельскохозяйственном производстве, в частности в растениеводстве.

Технологии низкого уровня с минимальными затратами материальных ресурсов, энергии и человеческого труда называют *экстенсивными* (например, повышение плодородия почв путем вывоза на поля навоза и торфа, заправки пожнивных остатков и/или сидератов — специально выращенных бобовых растений). Подобные технологии показали свою неэффективность уже в первой половине XX столетия. Так, при их применении продуктивность агроэкосистем мало отличается от продуктивности природных экосистем, что компенсируется расширением площадей сельскохозяйственных угодий: вырубаются леса (древесина используется на топливо, для производства бумаги), распахиваются степи. Вырубка лесов и распашка степей неизбежно сопровождаются эрозией почв, оскудением водных ресурсов.

Более эффективны *интенсивные технологии низкого уровня*, и в первую очередь технологии внедрения новых сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов. Качество сортов (пород, штаммов) определяется их повышенной продуктивностью при увеличении затрат человеческого труда, сырьевых и энергетических ресурсов, все более активном внедрении средств механизации, автоматизации и химизации.

Распространение подобных технологий характерно для второй половины XX в. Так, в Великобритании в период с

1950 по 1980 г. удалось увеличить урожайность зерновых в два раза (по 50 % прироста получено соответственно за счет внедрения новых интенсивных сортов и за счет увеличения затрат сырьевых и энергетических ресурсов). В настоящее время в экономически развитых странах на производство одной пищевой калории затрачивается пять — семь калорий ископаемого топлива.

Однако в результате применения интенсивных технологий низкого уровня многократно усиливается локальная нагрузка на природные экосистемы, происходит механическая эрозия почв, возрастает загрязненность их минеральными удобрениями и средствами защиты растений. Увеличивается и глобальная нагрузка на биосферу, в первую очередь за счет выбросов углекислого газа: количество CO_2 , образующегося при сжигании ископаемого топлива, в несколько раз больше, чем количество CO_2 , ассимилирующегося в ходе фотосинтеза в агроэкосистемах. Одним из самых существенных недостатков интенсивных технологий является резкое снижение качества продукции (такую продукцию часто называют экологически грязной).

Уже в 1970-е гг. стало ясно, что использование технологий низкого уровня — это тупиковый путь. Выходом из него стало использование **прорывных технологий**, базирующихся на самых современных достижениях науки и техники. В свое время таковыми стали технологии микробиологического синтеза (например, получение антибиотиков), технологии клеточной инженерии (например, гибридизация соматических клеток и клонирование организмов), технологии генетической инженерии (например, получение векторов переноса ДНК и создание трансгенных организмов).

Прорывные, принципиально новые технологии могут быть опасны для человека и окружающей среды, поскольку последствия их применения непредсказуемы. Внедрение прорывных технологий, как правило, сопровождается появлением новых видов продуктов и новых видов отходов. Любой новый пищевой или промышленный продукт должен проходить всестороннюю проверку на аллергенность, канцерогенность и мутагенность, на совместимость с другими продуктами, на безопасность для окружающей среды и т. д.

На основе прорывных технологий создаются **биотехнологии высокого уровня** (или просто **высокие биотехнологии**). В противоположность технологиям низкого уровня, высокие биотехнологии характеризуются высокой наукоемкостью, т. е. использованием систем, полученных самыми современными методами генетики, микробиологии, цитологии, экологии, молекулярной биологии. Материалы, применяемые в высоких биотехнологиях, часто нуждаются в специальной подготовке. Все это требует специального технологического оборудования и высококвалифицированных специалистов, а на современном этапе — автоматизации и компьютеризации производства. Такие технологии используют в сельскохозяйственном производстве, здравоохранении, в различных областях науки, при планировании и проведении природоохранных мероприятий.

Высокие биотехнологии также подразделяют на экстенсивные и интенсивные. *Экстенсивные высокие биотехнологии* характеризуются относительно низкими затратами сырьевых и энергетических ресурсов. К технологиям подобного типа относится большинство микробиологических производств, технологических процессов по подготовке и переработке промышленного сырья, а также часть производства продукции на основе тканево-клеточных культур. Эти технологии частично интенсифицируются за счет компьютеризации производства.

Интенсивные высокие биотехнологии (в противоположность экстенсивным) реализуются с привлечением специалистов высочайшей квалификации, с использованием уникального оборудования и самых современных материалов. Эти биотехнологии применяют в медицине, а также для создания организмов с заранее заданными свойствами. Нужно отметить, что интенсификация высоких технологий, в отличие от интенсификации технологий низкого уровня, заключается в повышении качества ресурсного и информационного обеспечения.

Технологии разных уровней неразрывно связаны между собой: с одной стороны, высокие технологии базируются на технологиях низкого уровня, для их осуществления требуется определенный ресурсный, энергетический и информа-

ционный фундамент, с другой — достижения высоких технологий используются на низших уровнях биотехнологических производств.

Высокие технологии представляют собой величайшее достижение человеческого разума. Однако по ряду параметров они не только не превосходят технологии низкого уровня, но даже и уступают им. В частности, высокие технологии требуют все больших вложений всех видов ресурсов, они не решают проблемы получения экологически чистой продукции, а само биотехнологическое производство может представлять угрозу для человека и окружающей среды.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие науки внесли большой вклад в развитие биотехнологии?
2. Перечислите основные этапы развития биотехнологии.
3. Какие продукты получают методами биотехнологии и в каких отраслях народного хозяйства они находят применение?
4. Дайте определение термина «технология» и перечислите виды технологий.
5. Чем отличаются физические и химические технологии?
6. Что такое биотехнология и каковы ее цели?
7. Перечислите приоритетные для народного хозяйства направления биотехнологии.
8. Какие первоочередные задачи стоят перед биотехнологами?
9. Производство каких продуктов биотехнологии осуществляется с использованием микробиологического синтеза?
10. Назовите методы, используемые для получения генетически модифицированных организмов.
11. Расскажите о технологиях низкого уровня.
12. Что такое интенсивные технологии? Приведите примеры.
13. Расскажите о прорывных технологиях и их преимуществах, по сравнению с другими видами технологий.
14. Что вы знаете о биотехнологиях высокого уровня?
15. Перечислите отличия между экстенсивными и интенсивными высокими биотехнологиями.

Глава 2

ОСНОВНЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И ИХ НАРОДНОХОЗЯЙСТВЕННОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Объекты, используемые в биотехнологии (они включают представителей как прокариот, так и эукариот), чрезвычайно разнообразны по своей структурной организации и биологическим характеристикам. К объектам биотехнологии относятся:

- вирусы;
- бактерии и цианобактерии;
- водоросли;
- лишайники;
- грибы;
- водные растения;
- клетки растений и животных.

В группу низших растений входят и микроскопически малые организмы (одноклеточные и многоклеточные), и очень крупные по размерам. Но все они объединены такими общими признаками, как отсутствие расчленения тела на вегетативные органы и разнообразие способов размножения.

К низшим относят следующие отделы: Вирусы, Бактерии, группа отделов Водоросли (Синезеленые, Зеленые, Дiatомовые, Бурые, Красные и др.), Миксомицеты, Грибы, Лишайники. По способу питания их подразделяют на две группы: автотрофы (водоросли и лишайники), способные к фотосинтезу, и гетеротрофы (вирусы, бактерии — за небольшим исключением, — миксомицеты, грибы), использующие для питания готовые органические вещества.

Низшие растения прошли длинный исторический путь развития, но многие их представители до сих пор сохранили черты примитивной организации. На определенном эта-

пе развития они дали начало высшим растениям, венцом которых являются покрытосеменные.

2.1. Вирусы

Вирусы (от лат. *virus* — яд) — это мельчайшие организмы (не более 200–300 нм), невидимые в световой микроскоп, не имеющие клеточного строения, лишенные собственных систем энергообеспечения, отличающиеся паразитическим способом существования, т. е. являющиеся внутриклеточными паразитами. Детальное изучение вирусов стало возможным с развитием электронной микроскопии, биохимии, молекулярной биологии.

Вирусы — сборная группа, не имеющая общего предка.

Структура. Вирусные частицы (вирионы) имеют белковую капсулу — капсид, содержащий геном вируса, представленный одной или несколькими молекулами ДНК или РНК. Капсид построен из капсомеров — белковых комплексов, состоящих, в свою очередь, из протомеров. Вирионы часто имеют правильную геометрическую форму (икосаэдр, цилиндр). Такая структура капсида предусматривает идентичность связей между составляющими ее белками и, следовательно, может быть построена из стандартных белков одного или нескольких видов, что позволяет вирусу «экономить» место в геноме. Белки капсида комплементарны определенным молекулярным структурам в клетке хозяина и вступают с ними во взаимодействие, необходимое для проникновения и существования вируса. Капсид защищает вирус только вне живой клетки. Вне клетки-хозяина вирусы ведут себя как вещество (могут быть получены в кристаллической форме); попав в живую клетку, они вновь проявляют активность.

Механизм инфицирования. Условно процесс вирусного инфицирования в масштабах одной клетки можно разбить на следующие этапы.

Присоединение к клеточной мембране — так называемая адсорбция. Обычно, для того чтобы вирус адсорбировался на поверхности клетки, она должна иметь в составе своей плазматической мембраны специфический белок

(часто гликопротеин) — рецептор, специфичный для данного вируса. Наличие рецептора нередко определяет круг хозяев данного вируса, а также его тканеспецифичность.

Проникновение в клетку. На этом этапе вирусу необходимо доставить внутрь клетки свою генетическую информацию. Некоторые вирусы привносят также собственные белки, необходимые для ее реализации. Различные вирусы для проникновения в клетку используют разные стратегии. Вирусы также различаются по локализации их репликации: часть вирусов размножается в цитоплазме клетки, а часть — в ее ядре.

Перепрограммирование клетки. При заражении вирусом в клетке активируются специальные механизмы противовирусной защиты. Зараженные клетки начинают синтезировать сигнальные молекулы, например интерфероны, переводящие окружающие здоровые клетки в противовирусное состояние и активирующие системы иммунитета. Повреждения, вызываемые размножением вируса в клетке, могут быть обнаружены системами внутреннего клеточного контроля, и такая клетка должна будет «покончить жизнь самоубийством» в ходе процесса, называемого **апоптозом** (или программируемой клеточной гибелью). От способности вируса преодолевать системы противовирусной защиты напрямую зависит его выживание. Неудивительно, что многие вирусы, эволюционируя, приобрели способность подавлять синтез интерферонов, апоптозную программу и т. д. Кроме подавления противовирусной защиты, вирусы стремятся создать в клетке максимально благоприятные условия для развития своего потомства.

Персистенция. Некоторые вирусы могут переходить в латентное состояние (так называемая персистенция), слабо вмешиваясь в процессы, происходящие в клетке, и активироваться лишь при определенных условиях. На этом построена, например, стратегия размножения некоторых бактериофагов: до тех пор пока зараженная клетка находится в благоприятной среде, фаг не убивает ее, наследуется дочерними клетками и нередко интегрируется в клеточный геном. Однако при попадании зараженной фагом бактерии в неблагоприятную среду возбудитель захватывает конт-

роль над клеточными процессами так, что клетка начинает производить материалы, из которых строятся новые фаги. Клетка превращается в «фабрику», способную производить многие тысячи фагов. Зрелые частицы, выходя из клетки, разрывают клеточную мембрану, тем самым убивая клетку. С персистенцией вирусов связаны некоторые онкологические заболевания.

Создание новых вирусных компонентов. Размножение вирусов в самом общем случае предусматривает три процесса:

- транскрипцию вирусного генома, т. е. синтез вирусной мРНК;
- трансляцию мРНК, т. е. синтез вирусных белков;
- репликацию вирусного генома.

У многих вирусов существуют системы контроля, обеспечивающие оптимальное расходование биоматериалов клетки-хозяина. Например, когда вирусной мРНК накоплено достаточно, транскрипция вирусного генома подавляется, а репликация, напротив, активизируется.

Созревание вирионов и выход из клетки. В конце концов новосинтезированные геномные РНК или ДНК «одеваются» соответствующими белками и выходят из клетки. Следует отметить, что активно размножающийся вирус не всегда убивает клетку-хозяина. В некоторых случаях дочерние вирусы отпочковываются от плазматической мембраны, не вызывая ее разрыва. Таким образом, клетка может продолжать жить и продуцировать вирус.

Классификация вирусов. Систематику и таксономию вирусов кодифицирует и поддерживает Международный комитет по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), поддерживающий также и таксономическую базу The Universal Virus Database ICTVdB.

Форма представления генетической информации лежит в основе современной классификации вирусов. В настоящее время их подразделяют на ДНК- и РНК-содержащие вирусы.

К вирусам относятся бактериофаги — паразиты микроорганизмов. Они состоят из двух частей: призматической головки и хвостового отростка. Если добавить к микробам бактериофаг, действующий именно на данный вид микро-

бов, через несколько минут его можно обнаружить на поверхности микробной клетки, к которой он прикрепляется отростком. Затем бактериофаг выделяет фермент, растворяющий оболочку бактерии в месте прикрепления отростка. Сквозь это отверстие ДНК, находящаяся в головке, попадает в клетку. Капсид остается снаружи. Под влиянием ДНК фага обмен веществ бактерии перестраивается, белок-синтезирующие системы бактерии образуют белки фага, происходит репликация фаговой ДНК. Через 15–30 мин оболочка клетки разрывается, и огромное количество фагов выходит в окружающую среду. Фаги заражают новые клетки, вызывая их лизис.

Значение вирусов. Вирусы вызывают ряд опасных заболеваний человека (оспу, гепатит, грипп, корь, полиомиелит, СПИД, рак и т. д.), растений (мозаичную болезнь табака, томата, огурца, карликовость, увядание земляники), животных (чуму свиней, ящур). Однако препараты соответствующих бактериофагов применяют для лечения бактериальных заболеваний — дизентерии и холеры.

Получение интерферона — особого клеточного белка, препятствующего размножению вирусов, — широко используют в медицине, особенно во время вспышек эпидемий гриппа. Это вещество универсального действия, активное по отношению ко многим вирусам, хотя чувствительность разных вирусов к нему неодинакова. Будучи продуктом самой клетки, интерферон полностью лишен токсического воздействия на нее. Сейчас применяют готовый интерферон, его можно синтезировать в клетках, культивируемых вне организма.

2.2. Бактерии

До конца 1970-х гг. термин «бактерия» служил синонимом прокариот, но в 1977 г. на основании данных молекулярной биологии прокариоты подразделили на царства архебактерий и эубактерий (собственно бактерий).

Строение бактерий. Подавляющее большинство бактерий (за исключением актиномицетов и нитчатых цианобактерий) одноклеточны. По форме клеток они могут быть

шаровидными (кокки), палочковидными (бациллы, клостридии, псевдомонады), извитыми (вибрионы, спириллы, спирохеты), реже — звездчатыми, тетраэдрическими, кубическими, С- или О-образными. Обязательными клеточными структурами бактерий являются:

- нуклеоид;
- рибосомы;
- цитоплазматическая мембрана (ЦПМ).

Прокариоты, в отличие от эукариот, не имеют в цитоплазме обособленного ядра. Вся необходимая для жизнедеятельности бактерий генетическая информация содержится в одной двухцепочечной ДНК (бактериальная хромосома), имеющей форму замкнутого кольца. Она в одной точке прикреплена к ЦПМ. ДНК в развернутом состоянии имеет длину более 1 мм. Бактериальная хромосома представлена обычно в единственном экземпляре, т. е. практически все прокариоты гаплоидны, хотя в отдельных случаях одна клетка может содержать несколько копий своей хромосомы. Деление хромосомы сопровождается делением клетки. Область клетки, в которой локализована хромосома, называется нуклеоидом; она не окружена ядерной мембраной. В связи с этим новосинтезированная мРНК сразу доступна для связывания с рибосомами, т. е. процессы транскрипции и трансляции могут протекать одновременно. Ядрышка нет.

Помимо хромосомы, в клетках бактерий часто находятся плазмиды — замкнутые в кольцо небольшие молекулы ДНК, способные к независимой репликации. Они содержат дополнительные гены, необходимые лишь в специфических условиях. В них кодируются механизмы устойчивости к отдельным лекарственным препаратам, способности к переносу генов при конъюгации, синтеза веществ антибиотической природы, способности использовать некоторые сахара или обеспечивать деградацию ряда веществ. То есть плазмиды действуют как факторы адаптации. В некоторых случаях гены плазмиды могут интегрировать в хромосому бактерии.

Рибосомы прокариот отличаются от таковых у эукариот и имеют константу седиментации 70 S (у эукариот — 80 S).

У разных групп прокариот имеются локальные впячивания ЦПМ — мезосомы, выполняющие в клетке разнообразные функции и разделяющие ее на функционально различные части. Считается, что мезосомы принимают участие в делении бактерий. Когда на мембранах мезосом располагаются окислительно-восстановительные ферменты, они являются эквивалентами митохондрий клеток растений и животных. У фотосинтезирующих бактерий во впячивания мембран вмонтирован пигмент — бактериохлорофилл. С его помощью и осуществляется бактериальный фотосинтез.

С внешней стороны от ЦПМ находятся несколько слоев (клеточная стенка, капсула, слизистый чехол), называемых клеточной оболочкой, а также поверхностные структуры (жгутики, ворсинки, пили).

У бактерий существует два основных типа строения клеточной стенки, свойственных грамположительным и грамотрицательным видам. Клеточная стенка грамположительных бактерий представляет собой гомогенный слой толщиной 20–80 нм, построенный в основном из пептидогликана муреина с большим количеством тейхоевых кислот и небольшим количеством полисахаридов, белков и липидов. У грамотрицательных бактерий пептидогликановый слой неплотно прилегает к ЦПМ и имеет толщину лишь 2–3 нм. Он окружен наружной мембраной, имеющей, как правило, неровную, искривленную форму.

С внешней стороны от клеточной стенки может находиться капсула — аморфный слой гидратированных полисахаридов, сохраняющий связь со стенкой. Слизистые слои не имеют связи с клеткой и легко отделяются, чехлы же не аморфны, а имеют тонкую структуру.

Многие бактерии способны к активному движению с помощью жгутиков — выростов цитоплазмы.

Размножение бактерий. Бактерии не имеют полового процесса и размножаются лишь равновеликим бинарным поперечным делением или почкованием. Для одной группы одноклеточных цианобактерий описано множественное деление (ряд быстрых последовательных бинарных делений, приводящих к образованию от 4 до 1000 новых клеток под оболочкой материнской клетки).

У прокариот может происходить горизонтальный перенос генов. При конъюгации клетка-донор в ходе непосредственного контакта передает клетке-реципиенту часть своего генома (в некоторых случаях — весь геном). Участки ДНК донорной клетки могут обмениваться на гомологичные участки ДНК реципиента. Вероятность такого обмена значима только для бактерий одного вида.

Бактериальная клетка может поглощать и свободно находящуюся в среде ДНК, включая ее в свой геном. Данный процесс носит название трансформации. В природных условиях обмен генетической информацией протекает с помощью бактериофагов (трансдукция). При горизонтальном переносе новых генов не образуется, однако осуществляется создание разных генных сочетаний. Эти свойства бактерий очень важны для генетической инженерии.

Спорообразование у бактерий. Некоторые бактерии образуют споры. Их формирование характерно для особо устойчивых форм с замедленным метаболизмом и служит для сохранения в неблагоприятных условиях, а также для распространения. Споры могут сохраняться продолжительное время, не теряя жизнеспособности. Так, эндоспоры многих бактерий способны выдерживать 10-минутное кипячение при 100 °С, высушивание в течение тысячи лет и, по некоторым данным, сохраняются в жизнеспособном состоянии в почвах и горных породах миллионы лет.

Метаболизм бактерий. За исключением некоторых специфических моментов, биохимические пути, по которым осуществляется синтез белков, жиров, углеводов и нуклеотидов, у бактерий схожи с таковыми у других организмов. Однако по числу возможных биохимических путей и, соответственно, по степени зависимости от поступления органических веществ извне бактерии различаются. Часть бактерий может синтезировать все необходимые им органические молекулы из неорганических соединений (автотрофы), другие же требуют готовых органических соединений, которые они способны лишь трансформировать (гетеротрофы).

Классификация бактерий. Наибольшую известность получила фенотипическая классификация бактерий, основанная на строении их клеточной стенки. На основе этой

классификации построен «Определитель бактерий Берги», девятое издание которого вышло в 1984–1987 гг. Крупнейшими таксономическими группами в ней стали четыре отдела: *Gracilicutes* (грамотрицательные), *Firmicutes* (грамположительные), *Tenericutes* (микоплазмы) и *Mendosicutes* (археи).

Значение бактерий. Бактерии-сапрофиты играют большую роль в круговороте веществ в природе, разрушая в экосистемах мертвый органический материал. Хорошо известна их роль во всех биогеохимических циклах на нашей планете. Бактерии принимают участие в круговоротах химических элементов (углерода, железа, серы, азота, фосфора и др.), в процессах почвообразования, определяют плодородие почв.

Многие бактерии «населяют» организмы животных и человека, стоят на страже здоровья.

Биотехнологические функции, выполняемые бактериями, разнообразны. Их применяют при производстве различных веществ: уксуса (*Gluconobacter suboxidans*), молочнокислых напитков и продуктов (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*), а также микробных инсектицидов (*Bacillus thuringiensis*) и гербицидов, белков (*Methylomonas*), витаминов (*Clostridium* — рибофлавин); при переработке отходов, получении бактериальных удобрений, растворителей и органических кислот, биогаза и фотоводорода. Широко используется такое свойство некоторых бактерий, как diaзотрофность, т. е. способность к фиксации атмосферного азота.

Благодаря быстрому росту и размножению, а также простоте строения, бактерии активно применяют в научных исследованиях по молекулярной биологии, генетике и биохимии, в генно-инженерных работах при создании геномных клонотек и введении генов в растительные клетки (агробактерии). Информация о метаболических процессах бактерий позволила производить бактериальный синтез витаминов, гормонов, ферментов, антибиотиков и др.

Перспективными направлениями являются очистка с использованием бактерий почв и водоемов, загрязненных нефтепродуктами или ксенобиотиками, а также обогащение руд с помощью сероокисляющих бактерий.

Нельзя забывать о том, что отдельные виды бактерий вызывают опасные заболевания у человека (чуму, холеру, туберкулез, брюшной тиф, сибирскую язву, ботулизм и др.), животных и растений (бактериозы). Некоторые виды бактерий могут разрушать металл, стекло, резину, хлопок, древесину, масла, лаки, краски.

2.3. Водоросли

Водоросли — наиболее древняя и разнородная группа организмов. Они обитают в водной среде, почве, на поверхности растений и в других местах. Большинство водорослей являются **автотрофами**, так как содержат хлорофилл и могут использовать солнечный свет, но нередко их зеленая окраска маскируется другими пигментами. Некоторые водоросли утратили способность к фотосинтезу и перешли на гетеротрофный тип питания.

Особенности строения водорослей. По строению тела различают одноклеточные, колониальные и многоклеточные водоросли. Оно может быть представлено *талломом*, или *слоевищем*, и не подразделяется на вегетативные органы. По форме многоклеточного таллома выделяют нитчатые, пластинчатые и сифоновые водоросли.

Клетки многих водорослей похожи на растительные. У них имеются клеточная стенка, одна крупная или несколько мелких вакуолей с клеточным соком, а также хлоропласты, которые называются **хроматофорами**. В хроматофорах находятся пигментные системы, в состав которых входят хлорофиллы (зеленые пигменты), каротиноиды (желто-оранжевые пигменты) и фикобиллины (сине-фиолетовые пигменты). Их соотношение определяет окраску водоросли.

Форма хроматофоров очень разнообразна. Она может быть пластинчатой, цилиндрической, лентовидной, чашевидной, звездчатой и т. д. В хроматофорах расположены *пиреноиды*, вокруг которых откладываются запасные вещества в виде крахмала или близкого к нему углевода.

Вегетативные клетки таллома снаружи покрыты твердой стенкой, состоящей из целлюлозы и пектиновых ве-

ществ. Иногда снаружи клеточная стенка покрыта или инкрустирована кремнеземом. Цитоплазма заполняет всю полость клетки или расположена послойно. В клетке находится одно или несколько ядер. Кроме крахмала, в качестве запасных продуктов могут накапливаться капельки масла.

Размножение водорослей. Для водорослей характерны, как правило, одноклеточные органы размножения, спороношения и полового размножения.

Размножение у водорослей может происходить тремя способами:

— *вегетативным* (деление клеток пополам, фрагментами колоний и нитей, специализированными структурами — клубеньками — у харовых);

— *собственно бесполом* (подвижными зооспорами и неподвижными апланоспорами);

— *половым* (с участием гамет или без образования гамет, путем слияния ядер вегетативных клеток).

Собственно бесполое размножение осуществляется с помощью зооспор или клеточных образований, возникающих внутри вегетативных клеток или в особых органах (зооспорангиях или спорангиях) путем деления их содержимого. Вскоре после выхода в воду через отверстия в стенке спорангия зооспоры сбрасывают жгутики, покрываются клеточной оболочкой и прорастают в новую особь.

Половой процесс возможен в формах:

— *изогамии*, при которой происходит слияние одинаковых по размеру и форме подвижных гамет;

— *гетерогамии*, при которой сливаются подвижные гаметы, имеющие одинаковую форму, но отличающиеся по размерам;

— *оогамии*, когда сливается неподвижная крупная женская гамета — яйцеклетка с мелким подвижным сперматозоидом.

У некоторых зеленых водорослей половой процесс осуществляется в форме *конъюгации*.

У одних водорослей одна и та же особь может образовывать гаметы или споры — в зависимости от возраста и условий окружающей среды, у других — функции полового и бесполого размножения выполняют разные особи.

Водоросли, на которых развиваются органы бесполого размножения, называются **спорофитами**, а водоросли, на которых развиваются половые органы, — **гаметофитами**. Эти два поколения в цикле развития организма могут сильно отличаться по структуре или, наоборот, быть внешне похожими друг на друга. Строго упорядоченные жизненные циклы, сходные с циклами высших растений, существуют лишь у эволюционно продвинутых видов, таких, как представители бурых и зеленых водорослей.

Классификация водорослей. Многочисленные виды водорослей отличаются между собой анатомическим строением как всей особи, так и отдельных клеток, различием в пигментах и других включениях и т. д. На основании этих признаков водоросли подразделяют на 10 отделов. Рассмотрим те из них, которые нашли применение в биотехнологии.

Бурые водоросли

Свое название бурые водоросли получили из-за высокого содержания в хроматофорах (помимо хлорофилла) бурого пигмента *фукоксантина*. Изучено около 1,5 тыс. видов этих водорослей, которые распространены главным образом в морях и океанах, преимущественно в прибрежном мелководье. Иногда их находят и вдали от берегов. Бурые водоросли считаются важным компонентом бентоса.

Постоянные скопления бурых водорослей известны в той части Атлантического океана, которое носит название Саргассово море (соответственно сами эти водоросли называют саргассами). Они не являются бентосными, а обладают плавучестью благодаря воздушным пузырькам, за счет которых постоянно дрейфуют. В прибрежной же части они ведут обычный бентосный образ жизни.

Таллом бурых водорослей многоклеточный, часто достигает гигантских размеров (до 30–50 м). У самых развитых, крупных видов таллом пластинчатый, т. е. многослойный, и разделен как бы на «ткани», выполняющие разные функции. Клетки бурых водорослей одноядерные. Многочисленные хлоропласты чаще дисковидные. Запасные продукты накапливаются в виде *ламинарина* (полисахарид), *манни-*

та (сахароспирт) и масла. Пектиново-целлюлозные клеточные стенки легко ослизняются. Продолжительность жизни бурых водорослей достигает нескольких лет.

Вегетативное размножение бурых водорослей может осуществляться обрывками таллома. У некоторых видов имеются выводковые почки, которые легко отламываются и вырастают в новую особь.

Бесполое размножение (отсутствует у фукусовых) происходит с помощью многочисленных двухжгутиковых зооспор, образующихся в одногнездных (изредка — в многогнездных) зооспорангиях, либо с помощью неподвижных тетраспор, образующихся в одногнездных тетраспорангиях.

Половой процесс у бурых водорослей встречается во всех формах. У простейших — в форме изо- или гетерогамии, у наиболее высокоорганизованных (например, у ламинарии) половой процесс оогамный. Размножение ламинарии происходит с помощью спор. Зооспоры у нее заключены в многочисленные спорангии, или мешочки. При выходе спор наружу окружающая вода приобретает мутный оттенок. Постепенно споры разносятся течением и оседают на дно, где прикрепляются к шероховатостям и прорастают. На развившихся ростках (*гаметофитах*) образуются разнополюе клетки. На одних ростках (мужских) появляются мелкие подвижные сперматозоиды, на других (женских) — яйцеклетки. Осенью происходит оплодотворение будущей ламинарии. Зигота вскоре прорастает в водоросль (*спорофит*), достигающую через год длины 4–5 м. Этой же осенью из развившегося растения выходят споры. Старое слоевище разрушается, и на его месте развивается новое, которое к весне следующего года достигает нормальной промысловой длины.

Основные представители: *ламинария*, *фукус*, *падина*, *макроцистис*, *алярия* и др.

Красные, или багряные, водоросли

Почти все красные водоросли являются морскими обитателями, обычными в бентосе, находящемся на значительной глубине. Лишь немногие из них обитают в пресноводных бассейнах и в почве.

Разнообразная окраска этих водорослей объясняется наличием, помимо хлорофилла, еще двух пигментов: красного — *фикоэритрина* и синего — *фикоцианина*. От соотношения этих пигментов окраска таллома может варьировать от малиново-красной до голубовато-стальной. Благодаря такому пигментному составу образуется специфический запасной продукт — *багрянковый крахмал*, который от йода приобретает буро-красный цвет.

Клеточные стенки вместе с межклеточным веществом у некоторых видов сильно ослизняются, из-за чего весь таллом приобретает слизистую консистенцию. В связи с этим многие красные водоросли используют для получения агар-агара.

Большинство красных водорослей — двудомные организмы. Они размножаются бесполом и прогрессивным половым путем. Многие «багрянки» характеризуются правильной сменой гаметофита и спорофита, внешне неотличимых друг от друга. У некоторых красных водорослей циклы развития носят сложный характер.

Основные представители: *порфира*, *филлофора*, *анфельция* и др.

Зеленые водоросли

Зеленые водоросли характеризуются травянисто-зеленой окраской, зависящей от преобладания хлорофиллов над каротиноидами. Клетка большинства таких водорослей покрыта целлюлозной оболочкой. У многих из них наблюдается свойственное высшим растениям правильное чередование бесполого и полового поколения; некоторые зеленые водоросли перешли к наземному существованию.

Представители этого отдела (около 15 тыс. видов) распространены в пресных водах, некоторые — в морях, и очень немногие обитают в условиях периодического увлажнения (на почве, стволах деревьев, заборах, цветочных горшках и т. д.).

Типичным представителем является водоросль рода *Хламидомонада*. Это одноклеточная водоросль, со жгутиками, многочисленные виды которой обитают в лужах, кана-

вах и других мелких пресных водоемах. В случае их массового развития вода нередко принимает зеленую окраску. При подсыхании водоема хламидомонады теряют жгутики, ослизняются и в таком неподвижном состоянии переживают неблагоприятные условия, а при попадании в воду клетки снова вырабатывают жгутики и возвращаются к подвижному состоянию. В благоприятных условиях эти водоросли интенсивно размножаются бесполом путем, формируя большое количество зооспор. У большинства видов половой процесс изогамный.

Род *Хлорелла* широко распространен в пресных водах, где эта водоросль придает воде зеленый цвет. Она встречается также на сырой земле, на коре деревьев и т. д. Хлорелла — представитель одноклеточных зеленых водорослей, у которых отсутствуют жгутики. При бесполом размножении содержимое клетки распадается, образуя от 4 до 64 дочерних клеток, которые освобождаются после разрыва стенки материнской клетки. Половой процесс отсутствует. В клетках хлореллы накапливается много запасных продуктов, витаминов, антибиотиков, поэтому ее культивируют в различных целях.

Ярким представителем зеленых водорослей, имеющих таллом в виде разветвленной нити, сложенной из одноядерных клеток, может служить род *Улотрикс*. Эти водоросли встречаются в прибойной полосе больших озер, образуя ва­тообразные обрастания на камнях.

К классу конъюгативных водорослей относится представитель рода *Спирогира*, имеющий нитчатый таллом без жгутиков. Многочисленные виды этого рода имеют лентовидные, спирально закрученные хроматофоры с пиреноидами, окруженные крахмальными зернами. Ядро находится в центре клетки и погружено в цитоплазму.

Половой процесс — конъюгация — заключается в слиянии протопластов вегетативных клеток. Это так называемая лестничная конъюгация, которая происходит между клетками параллельно расположенных нитей. Образовавшаяся в результате слияния протопластов конъюгирующих клеток зигота вырабатывает толстую стенку и переходит в состояние покоя. Ядра сливаются незадолго до прорастания

зиготы, после чего образуются четыре гаплоидных ядра, причем из четырех ядер только одно остается жизнеспособным и поэтому развивается только одна особь. Помимо конъюгации, широко распространено вегетативное размножение. Оно осуществляется благодаря разрыву нитей на отдельные участки, клетки которых начинают делиться и образуют новые нити.

Основные представители: *хлорелла*, *ульва*, *спирогира*, *улотрикс*, *вольвокс*, *эвглена* и др.

Диатомовые

Клеточные стенки диатомовых водорослей состоят в основном из кремнезема, образующего защитный панцирь, который имеет две отдельные части — теки: верхнюю — *эпитеку* и нижнюю — *гипотеку*. Пояс эпитеки плотно надвинут на поясок гипотеки. В створках теки имеются сквозные отверстия — поры, обеспечивающие обмен веществ, а также пустоты. Внутри клетки находятся протопласт и вакуоли. Ядро одно. Хлоропласты имеют бурую окраску, так как хлорофилл в них замаскирован бурыми пигментами — *каротиноидами* и *диатомином* (пигмент из группы ксантофиллов). Запасные продукты откладываются в виде масла, волютина и лейкозина.

Основные представители: *пиннулярия*, *навикула*, *мелозира*, *табеллярия* и др.

Значение водорослей. Водоросли, обитающие в воде, подразделяют на две большие группы: *планктонные* и *бентосные*.

Планктоном называют совокупность свободно плавающих в толще воды на небольшой глубине мелких — преимущественно микроскопических — организмов. Растительная часть планктона, образуемая водорослями, составляет **фитопланктон**. Значение фитопланктона для обитателей водоема огромно, так как им производится основная масса органических веществ, т. е. водоросли являются продуцентами в цепи питания.

К **бентосным** водорослям относятся особи, прикрепленные ко дну водоемов, находящиеся в воде на глубине 30–50 м.

Однако наиболее теневыносливые бурые и красные водоросли достигают глубины 100–200 м, а отдельные виды — 500 м и более.

Водоросли живут на почве и даже в атмосферном воздухе (некоторые виды хлореллы). Отдельные виды, попадая вместе с бактериями на бесплодные субстраты, становятся пионерами их заселения. Многие водоросли активно участвуют в процессе почвообразования. Азотфиксирующие водоросли (анабена) накапливают в почве азот. Некоторые виды водорослей (носток и др.) входят в состав комплексных организмов — лишайников.

Хозяйственное значение водорослей заключается в непосредственном использовании их в качестве пищевых продуктов или как сырья для получения различных веществ, ценных для человека.

Из многочисленных видов водорослей съедобными в настоящее время считаются 80 (в основном это морские виды — ламинария, порфира, ульва, спирулина и т. д.). Съедобные водоросли богаты минеральными веществами, особенно йодом. Среди красных водорослей порфира считается деликатесом во многих приморских странах. В Японии насчитывается более 300 наименований блюд из морской капусты. Одно из самых популярных блюд с водорослями — суши. Под общим названием тозуки биологи обнаружили ряд из шести видов водорослей — kombu, wakame, nori, hijiki и др., которые употребляют в пищу. По статистическим данным, только сырых водорослей японцы съедают в год лишь в 35 раз меньше по весу, чем риса, который, как известно, в этой стране считается блюдом номер один.

Одноклеточные водоросли выращивают в условиях мягкого теплого климата (Средняя Азия, Крым) в открытых бассейнах на специальной среде. К примеру, за теплый период года (шесть — восемь 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: углеводы — 40 %,

жиры — 7–10 %, витамины А (в 20 раз больше), В₂, К, РР и многие микроэлементы. Варьируя состав питательной среды, можно в клетках хлореллы сдвинуть процессы биосинтеза в сторону накопления либо белков, либо углеводов, а также активировать образование тех или иных витаминов. В клетках хлореллы содержится также антибиотик хлореллин.

Водоросли служат кормом для рыб и водоплавающих птиц. В ряде стран их используют как витаминную добавку к кормам для сельскохозяйственных животных. Так, во Франции, Шотландии, Швеции, Норвегии, Исландии, Японии, Америке, Дании и на Русском Севере водоросли прибавляют к сену или дают как самостоятельный корм коровам, лошадям, овцам, козам, домашней птице. Для этой цели строят заводы. Опыты, проведенные в Мурманской области России, показали, что водорослями можно заменить примерно 50 % сочных и 30 % грубых кормов в суточном рационе животного. При этом удои молока и яйценоскость у птиц повышались на 10 % и выше.

Водоросли могут служить удобрением. В таком качестве их широко применяют в Ирландии, Шотландии, Норвегии, Франции. Запахивание биомассы водорослей обогащает почву фосфором, калием, йодом и значительным количеством микроэлементов, а также пополняет почвенную азотфиксирующую микрофлору. При этом водоросли разлагаются в почве быстрее, чем навозные удобрения, и не засоряют ее семенами сорняков, личинками вредных насекомых, спорами фитопатогенных грибов. Применение водорослевого перегноя и запахивание штормовых выбросов на 140–300 % повышает урожайность не только злаковых культур (пшеницы, ячменя), но и овощей.

В Израиле на опытных установках проводят эксперименты с зеленой одноклеточной водорослью *Dunaliella*, которая способна синтезировать глицерол. *Dunaliella* может расти и размножаться в среде с широким диапазоном содержания соли: в морской воде и в почти насыщенных растворах Мертвого моря. Она накапливает свободный глицерол как осмопротектор, чтобы тем самым противодействовать высоким концентрациям солей в среде выращивания.

При таких условиях выращивания дуналиеллы на долю глицерола приходится до 85 % сухой массы клеток. В ней содержится также значительное количество β -каротина. Таким образом, культивируя эту водоросль, можно получать глицерол, пигмент и белок, что весьма перспективно с экономической точки зрения.

Красные водоросли (роды: анфельция, гелидиум, грацилярия) служат источником получения агар-агара (желирующего вещества, широко применяемого в кондитерской, бумажной, фармацевтической промышленности и в микробиологии). Получают агар-агар (далее — агар) длительным кипячением водорослей. После остывания образуется плотное желеобразное вещество, которое применяют при изготовлении мармелада, пастилы, стабилизации многих консервов, сиропов, шоколадных напитков, мороженого. Кожа, бумага или ткань, обработанные агаром, становятся более прочными и приобретают приятный блеск.

У других багрянок (роды: литотамнион, литофиллум) клеточные стенки инкрустированы известью, которая придает таллону твердость камня. Такие красные водоросли принимают участие в образовании коралловых рифов.

Зола водорослей служит сырьем для получения брома и йода. Со времен открытия йода (середина XIX в.) Норвегия и Шотландия извлекали его почти исключительно из донных водорослей. Во время Первой мировой войны, когда потребность в препаратах йода резко возросла, японские заводы, переработав миллионы тонн сырых водорослей, получили около 600 т йода.

Некоторые водоросли служат в качестве индикаторных организмов при определении степени загрязнения водоемов. Например, массовое развитие осциллятории — показатель степени загрязнения при биологическом анализе воды. Применяют водоросли и для биологической очистки сточных вод, а также — благодаря высокой скорости размножения — для получения биомассы, используемой в качестве топлива.

Известны горные породы (диатомиты, горючие сланцы, часть известняков), возникшие в результате жизнедеятель-

ности водорослей в прошлые геологические эпохи. Диатомин применяют в производстве материалов для звуковой и тепловой изоляции, при изготовлении фильтров для пищевой и химической промышленности, шлифовке металлов. Водоросли участвуют в образовании лечебных грязей.

Бурые водоросли образуют подводные луга с огромной фитомассой. Они приобретают все возрастающее значение как кормовые, пищевые, лекарственные и технические растения. В северных и умеренных широтах произрастает ламинария — морская капуста, таллом которой достигает в длину 20 м и содержит много незаменимой аминокислоты метионина, йода, углеводов, минеральных веществ и витаминов. Из ламинарии также получают *альгинит* — клеящее вещество, используемое в текстильной (ткани не выцветают и не промокают) и пищевой (при изготовлении консервов, соков) промышленности, при производстве мелованной бумаги. Альгинит повышает устойчивость лакокрасочных покрытий и строительных материалов. Эту водоросль культивируют в морях России и стран Юго-Восточной Азии.

Благодаря таким свойствам водорослей, как простота строения, быстрый рост и скорость размножения, их широко применяют в научных исследованиях по молекулярной биологии, генетике, генетической инженерии, биохимии и физиологии.

Предпринимаются попытки использовать некоторые высокопродуктивные и неприхотливые водоросли (например, хлореллу, которая синтезирует белки, жиры, углеводы, витамины и способна поглощать вещества, выделяемые человеком и животными) для создания замкнутого круговорота веществ в обитаемых отсеках космических кораблей.

2.4. Лишайники

Лишайники — это симбиотические ассоциации микроскопических грибов и зеленых микроводорослей и/или цианобактерий, образующие слоевища (талломы) определенной структуры. Они выделяют кислоты и тем самым вносят существенный вклад в процессы почвообразования. Лишай-

ники можно отнести к пионерам, т. е. к первым организмам, заселяющим субстрат в процессе первичной сукцессии.

Преимуществом лишайников является устойчивость к экстремальным условиям (засухе, морозам, высоким температурам, ультрафиолетовому излучению). В то же время они проявляют повышенную чувствительность к загрязнению окружающей среды и могут служить индикаторами ее состояния.

Строение лишайников. Лишайники представляют собой симбиотическую ассоциацию фотосинтезирующего организма, или *фотобионта* (водоросли или цианобактерии), и гриба (*микобионта*). Водоросли и цианобактерии питаются автотрофно, но воду и ионы они берут от гриба. Как правило, грибной мицелий служит для водоросли защитной оболочкой, предохраняющей ее от высыхания. Сам гриб, неспособный синтезировать органические вещества, питается гетеротрофно ассимилятами партнера по симбиозу. Однако оба партнера могут существовать и как самостоятельные организмы.

По внутреннему строению лишайники подразделяют на:

— *гомеомерные*, когда клетки водоросли (фотобионта) распределены хаотично среди гиф гриба по всей толщине таллома;

— *гетеромерные*, когда таллом на поперечном срезе можно четко разделить на слои.

Большинство лишайников имеет гетеромерный таллом. В гетеромерном талломе верхний слой — корковый, сложенный гифами гриба. Он защищает таллом от высыхания и механических воздействий. Следующий от поверхности слой — гонидиальный. В нем располагается фотобионт. В центре имеется сердцевина, состоящая из беспорядочно переплетенных гиф гриба. В ней в основном запасается влага. Сердцевина выполняет также роль скелета. У нижней поверхности таллома часто находится нижняя кора, с помощью выростов которой (ризин) лишайник прикрепляется к субстрату.

В образовании лишайников участвует около 20 % из известных видов грибов (из них аскомицены — около 98 %, дейтеромицеты — около 1,6 %, базидиомицеты — около

0,4 %). Из водорослей в лишайниках наиболее распространена *Trebuxia*. Из цианобактерий часто встречаются *Nostoc*, *Calotrix*. Цианобактерии как симбионты лишайников способны осуществлять фотосинтез и фиксацию атмосферного азота.

По строению тела (таллома, или слоевища) лишайники бывают *накрупными* (корковыми), *листоватыми* и *кустистыми*. Они распространены по всему земному шару — от тропиков до приполярных областей. Хорошо известны такие лишайники, как исландский мох (*Cetraria islandica*) и виды *Usnea*, свешивающиеся с деревьев наподобие бороды и очень похожие внешне на цветковые эпифитные растения рода *Tillandsia*.

Размножение. Большинство лишайников способно регенерировать даже из мелких фрагментов слоевища, содержащих и фотобионт, и микобионт. У многих групп лишайников по краям или на верхней поверхности слоевища образуются особые выросты — изидии, которые легко отламываются и дают начало новому слоевищу. В других случаях клетка фотобионта в сердцевине лишайника окружается несколькими слоями гиф, превращаясь в крошечную гранулу, называемую соредией. Каждая соредия способна прорасти в новое слоевище. Хотя бесполое размножение лишайников достаточно эффективно, у грибов, образующих лишайники, широко распространен и половой процесс.

Значение лишайников. Лишайники настолько выносливы, что растут даже там, где отсутствует другая растительность, например в Арктике и Антарктике. Они первыми заселяют безжизненные субстраты, в частности камни, и начинают почвообразовательный процесс, необходимый для освоения этой среды растениями.

Ряд лишайников служит важным кормом для животных (например, ягель, или олений мох (*Cladonia rangiferina*), — корм северных оленей). При нехватке другой пищи его едят иногда и люди. Определенные виды лишайников считаются в Китае и Японии деликатесами.

Из лишайников можно получать красители, в частности лакмус, экстрагируемый из видов рода *Rocella*. Лакмус до

сих пор широко применяют в химических лабораториях для быстрого и простого определения реакции среды: в кислой среде он краснеет, а в щелочной синее. Другие лишайниковые красители в свое время использовали для окраски шерсти.

Лишайники очень чувствительны к загрязнителям воздуха, особенно к диоксиду серы (сернистому газу). При этом степень чувствительности варьирует у разных видов, поэтому их используют в качестве биоиндикаторов степени загрязнения окружающей среды.

Находят применение лишайники и в народной медицине, а выделяемые из них лишайниковые кислоты (усниновая кислота и др.) используют в качестве компонента лекарственных средств от ряда заболеваний, например кожных.

Из некоторых лишайников (дубовый мох *Evernia prunastri* и др.) получают душистые вещества, применяемые в парфюмерии.

2.5. Грибы

Грибы представляют собой обширную группу организмов, включающую около 100 тыс. видов. Это гетеротрофные организмы, лишенные хлорофилла. Минеральные вещества гриб способен усваивать из окружающей среды, однако органические вещества он должен получать в готовом виде.

По способу питания грибы подразделяют на *симбионты*, *сапрофиты*, *паразиты*. Симбионты вступают во взаимовыгодные отношения с растениями в форме *микоризы*. При этом гриб получает от растений необходимые ему органические соединения (углеводы и аминокислоты), в свою очередь снабжая растения неорганическими веществами и водой.

Строение грибов. Вегетативное тело большинства грибов — *мицелий* — представляет собой переплетение тонких ветвящихся нитей (гиф). Мицелий бывает *неклеточный* (лишен перегородок), представляющий собой как бы одну гигантскую клетку с множеством ядер, и *клеточный*, разделенный на клетки, содержащие одно или много ядер.

Клеточная стенка грибов содержит до 80–90 % полисахаридов, связанных с белками и липидами. Скелетные ее компоненты состоят из хитина или целлюлозы. Запасные продукты клеток грибов — гликоген, волютин, масло.

Размножение грибов. Грибы размножаются несколькими способами. *Бесполое размножение* может быть вегетативным и собственно бесполом. Под вегетативным размножением подразумевают почкование гиф или отдельных клеток (например, у дрожжей). Образующиеся почки постепенно отделяются, растут и со временем сами начинают почковаться. Собственно бесполое размножение осуществляется посредством спор и конидий, которые обычно образуются на специальных ветвях мицелия.

В зависимости от способа образования, различают эндогенные и экзогенные споры. *Эндогенные споры* характерны для бесполого размножения низших грибов. Они образуются внутри особых клеток, называемых **спорангиями**. *Экзогенные споры* обычно называют **конидиями**. Они имеются у высших и у некоторых низших грибов. Конидии образуются на вершинах или сбоку специальных гиф — конидиеносцев, ориентированных вертикально. Конидии покрыты плотной оболочкой, поэтому устойчивы, но неподвижны.

При *половом размножении* для низших грибов свойственно слияние гаплоидных клеток путем изогамии, гетерогамии и оогамии с образованием зиготы, которая покрывается толстой оболочкой, некоторое время проводит в состоянии покоя, после чего прорастает. В случае оогамии развиваются половые органы — оогонии (женские) и антеридии (мужские).

Классификация грибов. Классификация основных отделов царства грибов основана на способе их размножения.

Зигомицеты (Zygomycota)

Это грибы с неклеточным мицелием или с небольшим количеством перегородок; у наиболее примитивных — в виде голого комочка протоплазмы — амебоида или в виде одной клетки с ризоидами.

Основные представители: *мукор, ризопус*.

Аскомицеты, или сумчатые грибы (Ascomycota)

Это грибы с многоклеточным гаплоидным мицелием, на котором развиваются конидии. Характерно образование сумок с аскоспорами — основными органами размножения. Аскомицеты представляют собой одну из самых многочисленных групп грибов, которая насчитывает более 32 тыс. видов (примерно 30 % всех известных науке видов грибов). Их отличает огромное разнообразие — от микроскопических почкующихся форм до обладающих очень крупными плодовыми телами грибов.

Основные представители: *хлебные дрожжи, пеницилл, аспергилл, спорынья, пецица, сморчок.*

Базидиомицеты (Basidiomycota)

Это грибы с многоклеточным (как правило, дикариотическим) мицелием. Для них характерно образование базидий, несущих базидиоспоры. Группа включает подавляющее большинство грибов, употребляемых человеком в пищу, а также ядовитые грибы и многие грибы — паразиты культурных и диких растений. Всего насчитывается свыше 30 тыс. видов базидиальных грибов.

Основные представители: *белый гриб, шампиньон, мухомор* и т. д.

Аско- и базидиомицеты часто объединяют в группу высших грибов.

Дейтеромицеты, или несовершенные грибы (Deuteromycota)

В эту гетерогенную группу объединены все грибы с членистыми гифами, но с неизвестным до настоящего времени половым процессом. Насчитывается около 30 тыс. видов несовершенных грибов.

Значение грибов. Съедобные грибы (белые, сыроежки, грузди и др.) употребляют в пищу, но только после обработки. Наиболее ценный гриб — французский черный трюфель, для него характерен привкус прожаренных семечек

или грецких орехов. Этот гриб является деликатесом. Он растет в дубовых и буковых рощах, главным образом в Южной Франции и Северной Италии.

Искусственное выращивание съедобных грибов способно внести существенный вклад в дело обеспечения продовольствием все увеличивающегося населения земного шара. Необходимо сделать съедобные грибы такой же управляемой сельскохозяйственной культурой, как зерновые злаки, овощи, фрукты. Наиболее легко поддаются искусственному выращиванию древоразрушающие грибы.

В пищевой промышленности различные дрожжевые культуры применяют в хлебопечении, для приготовления уксуса и спиртных напитков (вина, водки, пива, кумыса, кефира), а плесневые культуры — для изготовления сыров (рокфор, камамбер), соевого соуса (*Aspergillus oryzae*), а также некоторых вин (херес).

Иногда грибы используют как источник галлюциногенов.

Грибы и препараты из них широко применяют в медицине. Некоторые виды грибов продуцируют важные вещества, в том числе антибиотики — пенициллы, стрептомицеты. В списке официальных препаратов содержатся многочисленные препараты из грибов, например из чаги, спорыньи. В восточной медицине используют цельные грибы — рейши (ганодерма), шиитаке и др.

Многие грибы способны к взаимодействию с другими организмами посредством своих метаболитов или прямо инфицируя их. Применение сельскохозяйственных пестицидных препаратов из некоторых грибов рассматривается как возможность управления размерами популяций вредителей сельского хозяйства, таких, как насекомые, нематоды.

В качестве биопестицидов (препарат *боверин*) используют, например, энтомопатогенные грибы. Мухомор издавна применялся как инсектицид.

Разнообразны и биотехнологические функции грибов. Их используют для получения таких продуктов, как:

- лимонная кислота (аспергиллус);
- гиббереллины и цитокинины (физариум и ботритис);

— каротиноиды (астаксантин, придающий мякоти лососевых рыб красно-оранжевый оттенок, вырабатывают грибы *Rhaffia rhodozima*);

— белок (*Candida, Saccharomyces lipolitica*);

— *Trichosporon cutaneum*, окисляющий многочисленные органические соединения, включая некоторые токсичные (например, фенол), играет важную роль в системах аэробной переработки стоков.

Плесени также продуцируют ферменты, используемые в промышленности (амилазы, пектиназы и т. д.).

Грибы принимают участие в образовании симбиотической *микоризы* с корнями высших растений. Гриб получает от дерева органические соединения, а сам делает воду и минеральные вещества доступными для поглощения и всасывания растением. Кроме того, гриб обеспечивает дерево большей поверхностью всасывания.

Однако некоторые грибы оказывают и отрицательное воздействие. Так, отдельные представители плесневых грибов существенно снижают урожай сельскохозяйственных культур. Грибы-древоразрушители вызывают быструю деструкцию деревьев и древесных материалов, поэтому рассматриваются как патогенные. Известно большое количество разнообразных патогенных грибов, вызывающих заболевания растений, животных и человека.

2.6. Водные растения

Водный папоротник *азолла* ценится как органическое азотное удобрение, поскольку растет в тесном симбиозе с синезеленой водорослью *анабена*. Необычность симбиоза состоит в том, что на корнях азоллы не образуются привычных клубеньков или иных выростов. Цианобактерии занимают полость на нижней стороне листочка папоротника, недалеко от его основания. По мере роста листа и размножения цианобактерий полость заполняется, а входное отверстие зарастает. Это позволяет симбиотическому организму *анабена-азолла* накапливать много азота в вегетативной массе. Для повышения урожая риса азоллу переносят на поля, уже залитые водой и засаженные молодыми рас-

теньцами риса. Поверхность воды быстро зарастает азолой, которая через некоторое время, с наступлением жаркого периода, отмирает, образуя большую массу органического удобрения. Распад биомассы папоротника после его отмирания происходит за неделю, а через месяц освобожденные соединения азота становятся доступными растениям. В результате урожайность риса возрастает на 20 %. Одновременно это позволяет снижать количество вносимых минеральных удобрений.

Представители семейства *Рясковых* (*Lemnaceae*) — свободноживущие водные плавающие цветковые растения, самые мелкие и простые по строению: их величина редко превышает 1 см. Вегетативное тело рясковых напоминает лист.

Рясковые (*Lemna minor*, *L. trisulca*, *Wolfia*, *Spirodela polyrhiza*) служат кормом для животных, для уток и других водоплавающих птиц, для рыб и ондатры. Их применяют и в свежем, и в сухом виде как ценный белковый корм для свиней и домашней птицы. Рясковые содержат много протеина (до 45 % от сухой массы), углеводов (45 %), жиров (5 %), остальное — клетчатка и т. д. Они высокопродуктивны, неприхотливы в культуре, хорошо очищают воду и обогащают ее кислородом. Это делает рясковых ценным объектом для морфогенетических, физиологических и биохимических исследований.

2.7. Высшие растения *in vivo* и *in vitro*

Мир растений определяет благополучие человечества. Известно, что 1,9 млрд т (99 %) употребляемого сухого вещества человечество получает из растений. Их широко используют в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, строительстве, при производстве тканей, бумаги, выработке энергии. Особый интерес представляет получение из растений различных химических соединений, биологически активных веществ (БАВ), из которых производят лекарственные препараты (фитопрепараты), химикаты для сельского хозяйства и пр.

Существенное повышение урожайности сельскохозяйственных культур в XX в. достигнуто за счет химизации, ме-

ханизации и мелиорации сельского хозяйства, что привело к загрязнению окружающей среды, истощению энергетических ресурсов, возрастанию затрат на единицу продукции. Приходится констатировать также, что повышение урожайности сельскохозяйственных культур данными методами в большинстве случаев достигло своего предела. Поэтому необходимо вести поиск новых подходов.

Наиболее перспективным в этом смысле является применение клеточной инженерии (клеточной и тканевой биотехнологии). Клеточная инженерия основана на использовании принципиально нового метода — метода изолированной культуры клеток эукариотических организмов (растений, животных). Выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах (*in vitro*) в стерильных условиях получило название метода культуры изолированных тканей.

Многочисленные факты и специально поставленные эксперименты показывают, что в процессе индивидуального развития и специализации растительных клеток генетическая информация в них не уменьшается. Все гены, как правило, сохраняются, и при соответствующих благоприятных условиях из каждой соматической клетки растения может развиваться целый организм. Это явление называется тотипотентностью. В тотипотентности заключается отличие клеток растений от клеток высших животных, для которых способность восстанавливать целый организм невозможна.

Все паренхимные клетки растения, в каких бы тканях они ни находились, содержат полный набор генов, такой же, какой имела зигота. Но в каждой ткани действует только часть генов, связанная с дифференциацией данного типа клеток. Одни гены функционируют во всех клетках организма (например, гены, контролирующие дыхание, проницаемость мембран, синтез АТФ), другие — только в определенных. Каждая специализированная клетка характеризуется своим набором активных генов. Чем более специализированы клетки, тем меньше в них активных генов. Разные гены работают не только в различных клетках, но и в разное время, на разных стадиях развития особи. В однотипных клетках одной и той же ткани на разных стади-

их развития организма непрерывно меняется набор активных генов. Одни гены включаются, синтезируя иРНК определенных белков, другие выключаются из этой работы.

Образование в процессе развития из однородных клеток зародыша разнообразных по морфологическим признакам и функциям типов клеток, тканей и органов называется **дифференциацией**. В основе дифференциации тканей лежат различия в активности генов. Центральная проблема онтогенетики — анализ действия гена при формировании признака и установление промежуточных звеньев в цепи «ген — признак».

В специализированных клетках работает ограниченная группа генов, тогда как большая часть их репрессирована. Но ДНК и гены во всех растительных клетках одинаковы, поэтому их активность должна определяться какими-то другими механизмами, включение которых не связано с действием генов. Такими механизмами активации генов являются различия в структуре цитоплазмы, тканевая индукция и гормоны. Яйцеклетка созревает под контролем генов, определяющих разнокачественность частей цитоплазмы, что приводит к неравноценности продуктов первых делений, а при дальнейшем размножении клеток — к тканевой дифференциации. Затем в процесс вступает эмбриональная индукция: воздействие одних тканей зародыша на другие. Это воздействие выражается в активации новых генов. Предполагают, что клетки ранее образующейся ткани выделяют вещества, способные активировать работу генов, необходимых для дифференциации другой ткани, т. е. происходит *тканевая индукция*.

Гормональная регуляция — наиболее хорошо изученный механизм активации генов. Гормоны могут воздействовать на гены непосредственно или вызывать появление в цитоплазме каких-то специфических веществ, воздействующих затем на них. Проникая в клетку, гормоны воздействуют на комплекс «гистоны — ДНК» и активируют отдельные локусы.

Особую роль в дифференциации тканей играют *гомеобоксовые гены*, группы которых содержат одинаковые элементы — гомеобоксы. Они служат адресом для гормональ-

ных веществ-регуляторов, определяя одновременную активацию или репрессию целого семейства генов. У растений гомеобоксовые гены были открыты в 1980-х гг. Показано, что они контролируют порядок возникновения и специализации метамеров.

Таким образом, растительная клетка — это весьма сложное образование, которое включает в себя различные микроскопические и субмикроскопические структуры, отличающиеся высокой динамичностью, способностью закономерно изменяться под влиянием условий существования.

Растения являются продуцентами многих БАВ — соединений, способных оказывать влияние на биологические процессы в организме. К таким соединениям принадлежат сердечные гликозиды, сапонины, стерины, каротиноиды, полифенолы, алкалоиды, витамины, хиноны, а также вещества, обладающие специфическим ароматом, вкусом и окраской.

Биологически активные вещества принадлежат к продуктам вторичного обмена, которые называют **вторичными метаболитами** или **вторичными продуктами биосинтеза**. В настоящее время известно более 100 тыс. вторичных метаболитов, продуцируемых растениями. Многие из них используются в фармакологической, косметической, пищевой промышленности и считаются экономически важными продуктами.

Лекарственные растения все еще вносят значительный вклад в фармацевтическую промышленность, составляя около 25 % важнейших лекарственных средств.

К лекарственным препаратам примыкают наркотики и стимулирующие вещества. Наркотики являются промежуточным звеном между ядами и лекарственными препаратами. В небольших количествах они часто служат эффективными лекарствами (например, морфий). При высоких концентрациях или при постоянном применении наркотики могут стать причиной пагубного влечения (наркомании) или смерти. Наркотики составляют основную группу запрещенных натуральных продуктов. Наиболее известны марихуана (или гашиш) — выделяют из *Cannabis*, опиум и героин — из *Papaver somniferum*, кокаин — из *Erythroxylon*.

Табак тоже принадлежит к этой группе, поскольку содержит никотин.

Стимуляторы представляет собой вещества, отличные от наркотиков, и в целом они не вредны. Чаще всего применяют в виде напитков кофеин и связанный с ним теобромин. Кофеин найден во многих растениях, из которых наиболее известны *Camellia sinensis* (чай) и *Coffea arabica* (кофе).

Яды, вероятно, крайнее лекарственное средство. Нейротоксические яды растений все еще используют охотники в Африке и Южной Америке, например яд кураре. Многие растительные яды обладают сильным нейротоксическим действием, например рицин из клещевины обыкновенной.

Помимо открытия регуляторов роста растений, наиболее выдающимся событием стало открытие пиретринов. Пиретрины, выделяемые из цветков *Chrysanthemum cinerariacfolium*, являются мощными *инсектицидами* (уничтожающие насекомых). С природными пиретринами конкурируют синтетические, однако при применении последних появляется устойчивость к ним у насекомых, а также возникает кумулятивная токсичность.

«Тонкие химикаты» — под этим общим названием объединены вещества, применяемые в качестве добавок при изготовлении духов, а также вкусовые ароматические вещества и красители пищевых продуктов. К «тонким химикатам» относятся и очень дорогие, выпускаемые в небольших количествах вещества, и дешевые препараты, производимые десятками тысяч тонн. Например, в США 1 кг жасминовой эссенции стоит 6 тыс. долларов и производится она в количестве лишь 20–30 кг в год, а 1 кг масла какао (основного компонента шоколада) стоит 4 доллара, и производится оно в объеме 20 тыс. т в год.

«Тонкие химикаты» варьируют от простых соединений типа хинина до сложных смесей типа эфирных масел. Последние представляют собой типичные монотерпены, часто летучие соединения, составляющие основу производства ароматических соединений для отраслей, создающих ценные и дорогостоящие продукты.

Следует отметить все возрастающее внимание к миру растений как источнику химических соединений. Разработ-

ка нового синтетического лекарственного препарата обходится примерно в 100 млн долларов и занимает 10 лет, поэтому нетрудно понять возобновляющийся интерес к растениям как «фабрикам» для их синтеза.

2.8. Животные *in vivo* и *in vitro*

В биотехнологии в качестве объектов при проведении фундаментальных научных исследований, а также в практических целях (терапия, фармакология, пищевая промышленность) используют животные организмы, а также культуры клеток животных, изолированные ткани и органы.

Культуры клеток животных служат главным образом для научных исследований. Так, культура клеток человека является объектом медико-биологических исследований при изучении клеточных, молекулярных, биохимических аспектов патогенеза целого ряда болезней, в том числе и наследственных; ее используют при исследовании возможностей применения и влияния лекарственных препаратов, БАВ, консервантов, косметических препаратов на морфологические и биохимические изменения в клетках. Для подобных исследований чаще всего применяют культуру фибробластов. Это связано с тем, что в 1978 г. А. Гринберг доказал адекватность результатов, полученных на культуре фибробластов, результатам, полученным на клетках целого организма. Кроме того, фибробласты служат главным клеточным элементом соединительной ткани, которая составляет значительную часть массы тела человека или животного.

Процессы клеточной дифференцировки и регуляции активности генов изучают в основном на культуре клеток беспозвоночных, так как они характеризуются большим разнообразием роста и метаморфозов. Эту же культуру применяют при выращивании вирусов в живых клетках насекомых для получения энтомопатогенных препаратов. В культурах клеток выращивают вирусы для их идентификации или для получения вакцин.

Клетки животных можно использовать для получения трансгенных особей, клонирования хозяйственно важных

пород животных, гибридизации соматических клеток с целью получения химерных организмов.

В последнее время большое внимание уделяется эмбриональным стволовым клеткам. Это клетки, выделенные из эмбрионов на стадии *бластоцисты*, сохраняющие способность делиться в культуре *in vitro*, обладающие свойством *плюрипотентности*, т. е. способностью к дифференцировке в любые типы клеток животных.

На органных культурах изучают закономерности развития органов, способы сохранения их жизнеспособности перед трансплантацией. Целые организмы (трансгенные мыши) используют для моделирования ряда болезней человека и выявления механизмов их возникновения и протекания.

Практическое применение изолированных клеток, тканей, органов, целых животных организмов также весьма разнообразно. Клетки животных и человека служат в качестве продуцентов каких-либо веществ, например противовирусного препарата интерферона. Созданы перевиваемые культуры клеток животных, которые продуцируют моноклональные антитела, применяемые для диагностики заболеваний. Некоторые клетки животных и человека в культуре могут синтезировать биологически активные вещества: клетки гипофиза служат источником соматотропина (гормона — регулятора роста), липотропина (гормона — стимулятора расщепления жиров). В промышленности широко используют иммобилизованные ферменты, ферментативные комплексы и клетки животных. На клетках и тканях изучают влияние низких температур на сохранение жизнеспособности клеток, а также разрабатывают методы криоконсервации для расширения разнообразия клеток и тканей, которые можно сохранять в замороженном состоянии. В медицине культуру клеток кожи применяют для заместительной терапии при ожогах, а культуру клеток эндотелия — для реконструкции стенок сосудов. В практических целях в качестве естественных биореакторов лекарственных препаратов или пищевых белков предполагается использовать крупный рогатый скот, овец, свиней; однако в настоящее время введение генов, отвечающих за синтез необходимых

соединений, сопровождается у трансгенных животных появлением тяжелых заболеваний и других негативных эффектов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные виды объектов, используемые в биотехнологии.
2. Расскажите о вирусах, их классификации и значении.
3. Какие клеточные структуры являются обязательными для бактерий?
4. Образование каких биотехнологических продуктов происходит с использованием бактерий?
5. Расскажите о классификации водорослей.
6. В чем отличие красных и зеленых водорослей?
7. Расскажите о планктонных и бентосных водорослях.
8. Какие виды водорослей используются в пищу?
9. Какие живые организмы относятся к лишайникам?
10. В чем выражаются особенности строения лишайников?
11. Какие продукты можно получать на основе лишайников?
12. На чем основана классификация основных отделов царства грибов? Перечислите их группы.
13. Приведите примеры продуктов грибного происхождения, получаемых методами биотехнологии.
14. Расскажите о водных растениях.
15. Перечислите возможности использования клеток высших растений в биотехнологии.
16. Что такое БАВ и какова их роль?
17. Расскажите о продуктах биотехнологии, получаемых из культур клеток и тканей высших растений.
18. Для каких целей используют культуры клеток животных?

Глава 3

КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Клеточная инженерия — один из основных разделов современной биотехнологии — позволяет выделять и культивировать ткани и клетки высших многоклеточных организмов. Культивирование тканей и клеток происходит вне организма — *in vitro* (в пробирке, колбе, стеклянной посуде), в специально подобранных условиях.

Клеточная инженерия основана на использовании принципиально нового объекта — изолированной культуры клеток или тканей эукариотических организмов, а также на таком уникальном свойстве растительных клеток, как **тотипотентность**, т. е. способность каждой растительной клетки давать начало целому организму (рис. 3.1, см. цв. вклейку). Применение этого объекта открывает большие возможности в решении глобальных теоретических и практических задач (рис. 3.2).



Рис. 3.2. Использование культуры клеток и тканей растений в биотехнологии (по Т.А. Егоровой и др., 2003)

В области фундаментальных наук это касается исследования таких сложных проблем, как взаимодействие клеток в тканях, клеточная дифференцировка, морфогенез, механизмы появления раковых клеток, реализация тотипотентности клеток.

При решении практических задач основное внимание уделяется селекции, получению значительных количеств биологически ценных метаболитов растительного происхождения (в частности, более дешевых лекарств), а также выращиванию оздоровленных безвирусных растений, их клональному размножению.

3.1. История развития метода клеточной и тканевой инженерии растений

Бурное развитие клеточной инженерии приходится на 1950-е гг., хотя первые попытки выращивания изолированных кусочков ткани были сделаны гораздо раньше. В настоящее время предлагается рассматривать следующие этапы становления и развития биотехнологии.

I этап (1892–1902 гг.). В конце XIX — начале XX в. немецкие ученые Х. Фёхтинг (1892), К. Рехингер (1893) и Г. Хаберландт (1902) предприняли первую попытку стимуляции роста растительных тканей и органов, помещенных на фильтровальную бумагу, пропитанную сахарозой. Несмотря на то что положительный результат не был получен, эти работы представляют большой интерес. Авторами были высказаны идеи, которые намного опередили развитие науки того времени и нашли свое подтверждение лишь несколько десятилетий спустя. Так, Фехтинг предположил, что полярность присуща не только организму или органу растения, но и самой клетке. Рехингер определил минимальный размер сегмента, образующего каллус (рис. 3.3, см. цв. вклейку). Согласно его исследованиям, в кусочках ткани тоньше 1,5–2,0 мм клетки не делились. Хаберландт впервые четко сформулировал идеи о возможности культивирования *in vitro* (в стекле) изолированных клеток растений и о *тотипотентности* клеток, т. е. способности любой соматической клетки полностью реализовывать свой потенциал развития.

II этап (1902–1922 гг.) ознаменовался созданием первых питательных сред для культивирования тканей животных. Эти среды были природного происхождения и содержали, как правило, плазму крови и зародышевую жидкость. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах, содержащих растительные экстракты, оказались неудачными, так как в экспериментах использовались мало подходящие для проявления ростовой активности клетки и ткани высших растений.

III этап (1922–1932 гг.) можно считать становлением метода культуры изолированных корней растения. В 1922 г. американский ученый В. Роббинс и немецкий ученый В. Котте — независимо друг от друга — показали возможность выращивания меристем кончиков корней томатов и кукурузы на синтетической питательной среде. Однако через определенное время растительные ткани бурели и погибали.

IV этап (1932–1940 гг.) связан с именами французского ученого Р. Готре и американского исследователя Ф. Уайта. В 1932 г. они показали, что при периодической пересадке на свежую питательную среду кончики корней могут расти неограниченно долго. Именно тогда началось подлинное развитие метода культуры растительных тканей. Эти ученые разработали методы культивирования новых объектов: тканей древесных растений камбиального происхождения, каллусных тканей запасающей паренхимы (Р. Готре), а также тканей растительных опухолей (Ф. Уайт).

Начинаются массовые исследования по разработке новых питательных сред, включающих даже такие неконтролируемые компоненты, как березовый сок или эндосперм кокоса. Работы по культуре ткани быстро развиваются, было успешно введено в культуру много новых объектов.

V этап (1940–1960 гг.). В 1955 г., после открытия Ф. Скугом и С. Миллером нового класса фитогормонов — цитокининов (и в частности, кинетина), оказалось, что при их совместном воздействии с другим классом фитогормонов — ауксинами — можно стимулировать деление клеток ткани сердцевинной паренхимы табака, лишенной проводящих

пучков и камбия. В зависимости от концентрации и соотношения фитогормонов, можно усиливать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез. На этом этапе было оценено положительное воздействие натуральных экстрактов типа эндосперма кокосового ореха, каштана, кукурузы и других растений на поддержание неорганизованного клеточного роста и стимуляцию процессов морфогенеза в культуре каллусных тканей и клеточных суспензий. В 1959 г. был предложен метод выращивания больших масс клеточных суспензий.

VI этап (1960–1975 гг.). Наиболее важное событие этого этапа — разработка профессором Ноттингемского университета (Англия) Э. Коккином метода получения ферментативным путем изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивирования их в контролируемых условиях. Позже, в 1970 г., в той же лаборатории С. Пауэром и сотрудниками было осуществлено искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию соматических гибридов. В этот же период был разработан метод клонального микроразмножения растений в условиях *in vitro* с использованием меристемной культуры. Основоположником данного направления исследований является французский ученый Ж. Морель, который получил оздоровленный посадочный материал орхидей и картофеля. Весьма важным достижением в развитии технологий культивирования изолированных тканей и клеток стало культивирование одиночной клетки с помощью ткани-«няньки» (рис. 3.4). Этот метод был разработан в России в 1969 г. в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН под руководством Р.Г. Бутенко.

VII этап (1975 г. — по настоящее время). Продолжается быстрое развитие технологии *in vitro* и изучение биологии культивируемых объектов. Разрабатываются методы электрослияния изолированных протопластов, мутагенеза и клеточной селекции, получения гаплоидных растений. Совершенствуется метод глубинного культивирования клеток с использованием изолированных протопластов и векторов, созданных на основе Ti- и Ri-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*. С помощью методов генетической

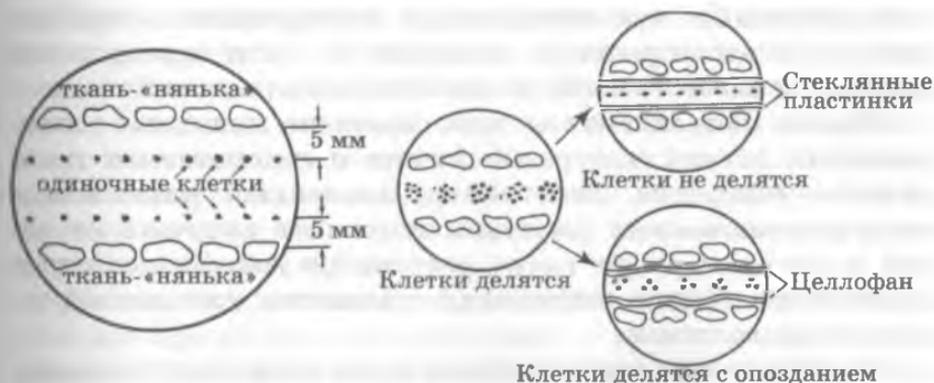


Рис. 3.4. Культивирование одиночных клеток высших растений с помощью ткани-«няньки» (по Р.Г. Бутенко, 1999)

инженерии разработан эффективный метод переноса генов для двудольных растений.

Таким образом, за последние десятилетия сделан значительный шаг вперед в развитии технических приемов работы с изолированными тканями и клетками растений. Объектом исследования, как правило, служили однодольные и двудольные травянистые растения, в редких случаях — древесные.

3.2. Основные направления клеточной инженерии растений

Культуры изолированных клеток и тканей применяют в биотехнологических работах по трем направлениям.

Первое направление — использование изолированных клеток в селекции растений *in vitro* на устойчивость к различным неблагоприятным факторам среды: засухе, засолению, низким и высоким температурам, фитопатогенам, тяжелым металлам и др. Также в рамках этого направления предусматриваются создание новых растений путем слияния изолированных протопластов и получение неполовых (соматических) гибридов; перенос в изолированные протопласты чужеродных генов методами генетической инженерии; культивирование изолированных пыльников и семян на искусственных питательных средах (создание гаплоид-

ных растений); культивирование изолированных зародышей и оплодотворение в условиях *in vitro* (преодоление прогамной и постгамной несовместимости растений).

Второе направление — использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала. Этот метод, названный **клональным микроразмножением** растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год. За последнее десятилетие данная технология становится уже коммерческим производством.

Наибольшее распространение метод клонального микроразмножения получил при культивировании декоративных, тропических и цветочных растений (табл. 2). Для картофеля, аспарагуса, земляники, некоторых подвоев яблони и персика он начинает заменять традиционные способы размножения и селекции.

Таблица 2

Промышленные культуры, выращенные *in vitro* в США, странах Азии и Европы в 2000 г. (млн шт.)

Культура	США	Европа	Азия
Цимбидиум гибридный (орхидея)	0,5	0,2	0,2
Бегония	2,5	10	—
Рододендрон	—	3,5	—
Гербера	2,5	—	0,5
Ирис гибридный	5,0	2,8	2,5
Папоротник	15	15	—
Фикус	1,7	4,5	—
Диффенбахия	6,0	—	—
Земляника	4,0	—	2,0
Картофель	7,0	—	—
Роза	—	5,7	—

Третье направление — получение ценных для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей промышленности веществ вторичного синтеза (алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др.) на основе клеточных культур растений. 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, аймалин — из клеток раувольфии змеиной, тонизирующие вещества — из клеток женьшеня. Продуктивность культивируемых клеток в результате их селекции *in vitro* может значительно превышать продуктивность целых растений. Преимущества данного способа заключаются также в возможности использовать для этой цели растения, не произрастающие в наших природных условиях, и получать продукцию круглый год.

3.3. Клетка как основа жизни биологических объектов

Основной формой существования жизни является клетка. В ней протекают все физиологические процессы как у одноклеточных, так и у многоклеточных организмов. Рост и размножение организмов также связаны с образованием новых клеток, которое зависит от происходящих в них биохимических процессов, называемых обменом веществ или метаболизмом.

Клетка является элементарной единицей жизни: в ней имеется все необходимое для поддержания обмена веществ и размножения. Соматические и половые клетки многоклеточных животных и растений, а также одноклеточные организмы в основном сходны по строению.

Среди живых организмов встречаются два типа организации клеток — это клетки, относящиеся к *прокариотической* и *эукариотической* группам. Переход от маленьких клеток — *прокариот* — со сравнительно простой внутренней структурой (клетки бактерий и синезеленых водорос-

лей) к большим по размеру и значительно более сложно устроенным *эукариотическим клеткам*, подобным клеткам высших животных и растений, произошел приблизительно 1,5 млрд лет назад.

Основные структурные различия про- и эукариот:

- наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;
- строение и химический состав клеточной стенки;
- наличие или отсутствие цитоплазматических органелл.

Наиболее простое строение имеют клетки *прокариотических* организмов. В них нет морфологически выраженного ядра, хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме и нет субклеточных цитоплазматических органелл. Клетка окружена ригидной клеточной стенкой. В оптимальных условиях прокариотическая клетка может делиться каждые 20 мин и таким образом менее чем за сутки давать жизнь более 10 млрд клеток.

Клетки всех остальных представителей живого мира относятся к *эукариотической* группе, потому что их обязательной структурой является клеточное ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной оболочкой. Кроме ядра и вакуолей, в цитоплазме существует целый набор специальных структур, или органелл, выполняющих специфические жизненно важные функции.

Ядро — центр, управляющий и координирующий жизнедеятельность всей эукариотической клетки. Оно имеет сложное строение, изменяющееся на разных этапах жизненного цикла клетки. Ядро окружено ядерной оболочкой (с двумя мембранами), пронизанной порами, через которые осуществляется обмен веществ между ядром и цитоплазмой. Внутри ядра находятся хроматин, одно или несколько ядрышек и ядерный сок — кариолимфа, или нуклеоплазма. Ядрышки — тельца, связанные с хромосомами. Они содержат большое количество рибонуклеиновой кислоты (РНК), в них происходит синтез рибосомной РНК.

Энергия в клетке вырабатывается *митохондриями* — особыми сферическими или палочковидными образованиями разнообразной величины и сложной структуры.

При исследовании цитоплазмы с помощью электронной микроскопии была открыта система мембран и канальцев, служащих продолжением клеточной мембраны и связанных с внешней мембраной ядерной оболочки. Эта система получила название **эндоплазматической сети** или **ретикулума**. По эндоплазматической сети канальцев, образуемых мембранами, передвигаются вещества внутри клетки. Здесь же имеются субмикроскопические частицы — рибосомы, состоящие из белков и РНК.

Важнейшими структурными элементами клетки являются **пластиды** — хлоропласты, лейкопласты, хромопласты и др., которые характерны для цитоплазмы растительных клеток. Хлоропласты содержат пигмент хлорофилл и участвуют в процессе фотосинтеза; бесцветные пластиды — лейкопласты — накапливают крахмал; хромопласты содержат пигменты каротиноиды, зупласты — жиры и пластидные нуклеиновые кислоты.

В цитоплазме клетки имеются также специфические органоиды: **комплекс Гольджи** (производное эндоплазматической сети), обеспечивающий выделительную и секреторную функции клетки; **лизосомы** — тела, содержащие ряд ферментов и выполняющие функцию внутреннего пищеварения клетки; **центросомы**, клеточный центр которых состоит из небольших телец (центриолей) и центросферы — особым образом дифференцированного участка цитоплазмы.

Клеточная мембрана имеет сложное строение, приспособленное к выполнению определенных функций: защитной, избирательной проницаемости и активного транспорта частиц и молекул. Активный транспорт молекул через клеточную мембрану происходит с помощью ионных каналов.

Передача наследственных признаков потомству как при вегетативном, так и при половом размножении осуществляется делением клеток. Изучение процессов деления эукариотических клеток показало, что из всех клеточных компонентов только хромосомы распределяются поровну между дочерними клетками. Это указывает на участие хромосом в передаче наследственных признаков. В результате деления

ядра каждая дочерняя клетка получает точно такой же набор хромосом, как у исходной родительской клетки. В этом «уравнительном» распределении хромосом ядра заключается генетическое значение митоза. Пластиды и митохондрии также размножаются путем деления, но их распределение по дочерним клеткам не подчиняется строгой закономерности.

Деление клетки состоит из двух основных этапов: первый — деление ядра — митоз (кариокинез), второй — деление цитоплазмы (цитокинез). Ядро клетки при делении проходит последовательные стадии: профазу, метафазу, анафазу и телофазу. Между двумя последовательными делениями клетки ядро находится в стадии интерфазы. Хотя интерфазу и называют стадией покоящегося ядра, метаболические процессы в ядре в этот период протекают наиболее активно. В синтетический период интерфазы происходит репликация ДНК.

Продолжительность всего митотического цикла (от 30 мин до 3 ч) зависит от вида и физиологического состояния организма, типа ткани, внешних факторов — температуры, света и др. Скорость прохождения отдельных фаз митоза также различна.

Новый организм при половом размножении возникает из зиготы — оплодотворенной яйцеклетки, которая образуется при слиянии гамет, т. е. мужской и женской половых клеток. Если бы каждая гамета вносила в зиготу полный набор хромосом родительского организма, тогда их число увеличивалось бы вдвое за каждое поколение. Мейоз, предшествующий образованию как женских, так и мужских половых клеток, является регулирующим механизмом, позволяющим сохранять постоянное число хромосом.

Мейоз — процесс деления ядра клетки, при котором наблюдаются конъюгация (слияние) гомологичных хромосом попарно и редукция (уменьшение) их числа в дочерних клетках. При мейозе ядро делится дважды. В результате первого мейотического деления образуются два ядра с половинным (гаплоидным) числом хромосом. Во втором делении каждое вновь образовавшееся ядро делится еще раз, но уже митотическим путем: расходятся сестринские хромати-

ды. Таким образом, из каждой клетки, вступившей в мейоз, после двух последовательных делений образуются четыре клетки с гаплоидным набором хромосом.

При мейозе не только уменьшается вдвое число хромосом, но и происходит перераспределение компонентов парных гомологичных хромосом по разным клеткам. При этом каждая пара ведет себя независимо. Редукции хромосом в мейозе предшествует слияние (конъюгация) гомологов, которое позволяет каждой паре гомологичных хромосом обмениваться участками. Это создает дополнительный резерв наследственных комбинаций при половом размножении организмов. Процесс обмена гомологичных хромосом своими частями получил название **кроссинговера**.

Таким образом, через комбинаторику гомологов из разных пар и кроссинговер мейоз резко увеличивает наследственную изменчивость нового поколения диплоидных организмов, возникающих после слияния гамет.

Возникшая после слияния отцовского и материнского ядер зигота содержит программу развития будущего организма, записанную в структурах молекул ДНК. Дочерние клетки развивающейся зиготы получают информацию, которая позволяет им во взаимодействии с условиями внешней среды формировать новый организм.

Вопрос о том, как возникла эукариотическая клетка, до сих пор является предметом многочисленных дискуссий. Отметим, что и прокариотическим, и эукариотическим клеткам растений присуще деление. Они также реагируют на раздражение и способны видоизменяться.

Первые прокариоты, по-видимому, были гетеротрофными организмами и использовали энергию восстановленных соединений, накопившихся в «добыологический» период. После того как запасы экзогенных восстановленных соединений были исчерпаны, для них наступил серьезный «энергетический кризис», который был преодолен с возникновением фотосинтеза и первых фотосинтезирующих бактерий (вероятно, это были цианобактерии).

В результате фотосинтеза на Земле существенно увеличилось содержание кислорода, появился озоновый слой и возникли аэробные формы прокариот (табл. 3).

Эволюция живых организмов на Земле

Время, млн лет до н. э.	Этап развития
3500–2000	Первые анаэробные бактерии (прокариоты); брожение; пентозофосфатный цикл; синтез АТФ
3400–1500	Цианобактерии (синезеленые прокариоты), зеленые прокариоты; биогенное образование кислорода
3000–2000	Аэробные прокариоты; фотосинтез зеленых аэробных прокариот
1000–700	Клетки эукариот; низшие растительные организмы
700–300	Высшие растительные организмы

В настоящее время нет единой теории возникновения эукариотической клетки; существует несколько гипотез на этот счет.

Первая гипотеза — симбиотическая — принадлежит Л. Маргулис. Согласно этой гипотезе, эукариотические клетки возникли в результате симбиоза двух (гетеротрофные эукариоты) или трех (фототрофные эукариоты) различных клеток. При этом произошел захват (слияние) большой ядерной клеткой одной или нескольких прокариотических клеток с дыхательной или фотосинтетической системами. Из этих прокариотических клеток в дальнейшем образовались соответственно митохондрии и хлоропласты. Ядро клетки-хозяина делится митозом и мейозом, тогда как митохондрии и хлоропласты размножаются простым делением.

Вторая гипотеза — мембранная, или инвагинационная. Согласно этой гипотезе, эволюция одной из аэробных прокариотических клеток и превращение ее в эукариотическую происходили путем инвагинации мембран. Такая клетка должна была иметь многочисленные геномы, каждый из которых был прикреплен к наружной мембране. При инвагинации мембран геномы сегрегировались, и в

процессе эволюции их функции разделились. Ядро эволюционировало и становилось все более сложным, тогда как органеллы сохраняли свои первичные функции, а некоторые из них либо передавали их ядру, либо теряли.

Третья гипотеза заключается в том, что прокариотические клетки образовывали скопления отдельных элементов генома. В ходе эволюции эти скопления клонировались, в результате чего функции некоторых клонов генома разделились. Отдельные клоны генома приняли участие в образовании и регуляции деятельности как органелл, так и ядра. Отбор будущих эукариот происходил при наиболее усложненной роли ядра.

Все эти гипотезы говорят о том, что процесс возникновения эукариотических клеток происходил разными путями и что на разных этапах естественного отбора эукариотические клетки получали возможность для эволюционных изменений ядра, митохондрий и хлоропластов. Есть также сведения о том, что почти 93 % всех ферментов, характерных для клеток эукариот, найдены и играют существенную роль и в жизни прокариот.

Симбиотическая гипотеза возникновения эукариот представляется наиболее простой и эффективной, недаром симбиоз у эукариотических и прокариотических растительных организмов существует и в наши дни. При этом митохондрии сохранили свою изначальную функцию — обеспечение аэробного дыхания. Хлоропласты хотя и подверглись изменениям пигментных систем, но также сохранили свою изначальную функцию — процесс фотосинтеза. Ядро сохранило двойную мембрану, как хлоропласты и митохондрии.

Представляет интерес сравнение культивируемых эукариотических клеток высших растений, существующих в условиях *in vitro*, с прокариотическими и эукариотическими клетками-организмами, существующими в природе. Это может оказаться полезным для выяснения происхождения и эволюции эукариотических клеток.

В эукариотической клетке *in vitro* возможно изменение состояния пластидного генома. В отдельных экспериментах можно получить фотосинтезирующие клетки и автотрофные суспензии, что позволит изучать развитие фотосинте-

тического аппарата. Представляет интерес изучение митохондрий в суспензионных культурах клеток. Установлено, что они могут сильно изменяться морфологически (менять форму). Существенно варьирует и геном митохондрий. Например, в культуре клеток *Vicia faba* изменялась популяция кольцевых ДНК митохондрий, в частности появлялись специфичные мини-кольцевые ДНК, по сравнению с проростками.

Выход растений на сушу был связан с приобретением ими многих новых функций, например появлением комплекса защитных покровов (эпидермис, кутикула), возникновением транспортных систем воды и веществ, а также синтезом специфических защитных веществ, в том числе и веществ вторичного метаболизма. В случае же культивируемых *in vitro* клеток растений рядом авторов отмечалось снижение их «эволюционного» уровня и проявление черт, свойственных более ранним ступеням развития. Так, в каллусной культуре чайного растения *Camellia sinensis* L. состав лигнина — основного компонента вторичных клеточных стенок — значительно отличался от такового исходных тканей и был близок к лигнину травянистых растений.

3.4. Дедифференциация — основа формирования клеточных культур растений

Возникновение каллуса связано с неорганизованным делением — **пролиферацией** — недифференцированных клеток, поэтому дедифференцировка лежит в основе формирования каллусной ткани.

У интактных растений дедифференцировка и индукция каллусогенеза происходят при механическом повреждении вследствие образования раневых гормонов (травматиновая кислота). В случае клеточных культур обязательным условием дедифференцировки тканей экспланта интактного растения и формирования на них каллусных клеток является не только повреждение (поранение), но и присутствие ауксинов и цитокининов в питательной среде. Функции этих двух групп гормонов в каллусогенезе разные, но они тесно связаны между собой. Ауксины вызывают процессы

дедифференцировки клетки, подготавливают ее к делению, тогда как цитокинины иницируют деление клеток. Новейшие исследования свидетельствуют о том, что ауксины индуцируют синтез протеинкиназ клеточного деления, а цитокинины — циклинов. Таким образом, действие этих гормонов проявляется только при последовательном или одновременном внесении их в среду. Кроме того, оно будет зависеть от физиологического состояния клеток экспланта, от их компетентности к действию тех или иных внешних факторов. Результаты исследований показали, что полисахариды и какие-то неизвестные индукторы тоже могут вызывать деление клеток, приводящее к образованию каллуса.

Во время процесса дедифференциации, который у всех клеток сходен, клетки должны утратить характерные черты исходной ткани. В первую очередь они теряют запасные вещества: крахмал, белки, липиды. В них не образуются специализированные клеточные органеллы, в частности хлоропласты, но возрастает число амилопластов. Кроме того, разрушается комплекс Гольджи, перестраиваются эндоплазматический ретикулум и элементы цитоскелета. Через несколько часов после перенесения экспланта в условия *in vitro* начинается новый синтез белка. Он связан, вероятно, с механическим повреждением тканей и действием гормонов, сохранившихся в экспланте при его изоляции из растения. Когда данные гормоны израсходуются, синтез белка прекращается. Если в это время клетки будут культивироваться на питательной среде, содержащей ауксины и цитокинины, то начнется каллусогенез, т. е. в результате дедифференцировки и деления клеток будет образовываться первичный каллус. Таким образом, специализированная клетка растительной ткани становится каллусной в результате дедифференцировки, т. е. восстановления у нее способности к делению.

3.5. Каллусные культуры растений

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

происходит на плотной поверхности питательной среды, содержащей агар, то образуется каллусная ткань (рис. 3.5, см. цв. вклейку).

Каллус («мозоль») может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) в условиях *in vitro*, так и на растении при поранении.

Каллусная культура — это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток.

Известный ученый-ботаник Н. Кренке более 50 лет назад посвятил часть своих работ изучению роли каллусной ткани в целом растении. Он установил, что в интактном растении каллусная ткань выполняет следующие функции:

- защитные (защищает места повреждений);
- запасные (запасание питательных веществ, синтез вторичных соединений);
- регенерационные (регенерация утраченных органов — корней, побегов).

Каллусную ткань в условиях *in vitro* можно получить практически из любой живой ткани растений, используя для этого определенные методические подходы.

В основном каллусы имеют белый или желтоватый цвет. Реже отмечается их светло-зеленая окраска и очень редко — интенсивно-зеленая, как это наблюдалось у каллуса мандрагоры. Темно-коричневая окраска чаще возникает при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них окисленных фенольных соединений (рис. 3.6, см. цв. вклейку). Для предотвращения этого процесса или его снижения в питательные среды вносят антиоксиданты.

Каллусная ткань обычно аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, хотя она может быть разной плотности, в зависимости от происхождения и условий выращивания (рис. 3.7).

По классификации Р.Г. Бутенко, существует три типа каллусной ткани (рис. 3.8, см. цв. вклейку):

- рыхлая, легко распадающаяся на отдельные мелкие агрегаты и состоящая из сильно оводненных клеток;
- средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами;

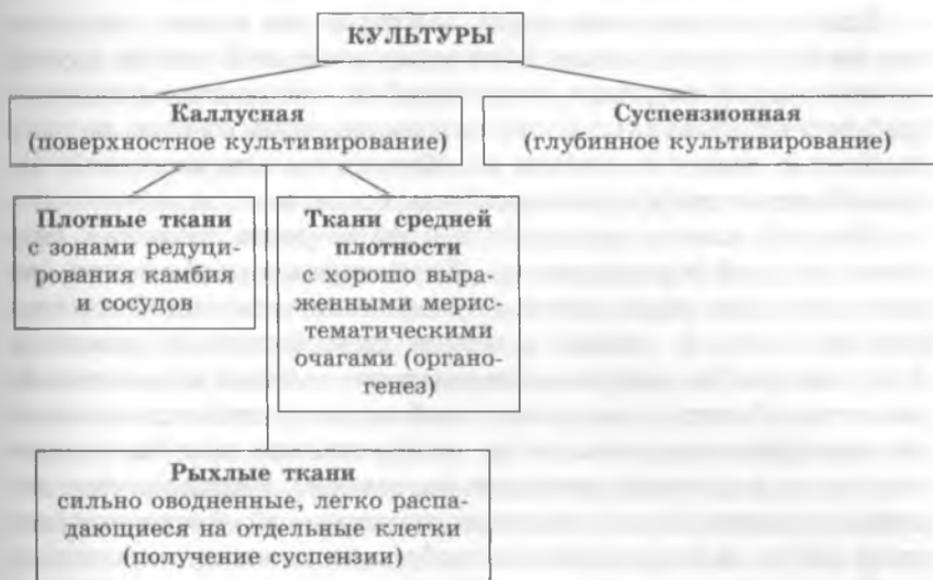


Рис. 3.7. Типы каллусных тканей высших растений
(по Т.А. Егоровой и др., 2003)

— плотная, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Любой тип плотности каллусной ткани можно превратить в другой, используя для этого следующие приемы:

- заменяя один ауксин на другой (например, ИУК — на 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д));
- изменяя концентрацию ауксина в питательной среде;
- увеличивая или уменьшая концентрацию соли хлорида кальция в питательной среде;
- добавляя в питательную среду ферменты (если необходимо получить каллусную ткань рыхлого типа).

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению, а цитокинины — пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток.

Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня (без верхушки) или любой другой растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению.

Каждая клетка проходит три фазы роста: деление, растяжение, дифференцировку. Характерные особенности заключительной фазы роста — утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря клеткой способности к делению. Для того чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т. е. чтобы клетки как бы возвратились в меристематическое состояние. Размножение дедифференцированных клеток приводит к неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань.

Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

Эффект, вызываемый воздействием одних и тех же фитогормонов, может быть различным, в зависимости от физиологической характеристики ткани-мишени. Компетентность ее определяется степенью дифференцировки клеток.

Ростовая кривая каллусных клеток имеет S-образную форму. Она включает пять фаз. Во время первой, *латентной*, или *лаг-фазы*, не происходит увеличения числа или массы клеток. Они в этот период подготавливаются к делениям. Вторая фаза — *логарифмическая*, или *экспоненциального роста*, — характеризуется наибольшей митотической активностью и увеличением массы каллусной культуры; кроме того, рост происходит с ускорением. Третья фаза — *линейная*, в которой скорость роста клеток постоянна. Далее наступает четвертая фаза — *замедленного роста*, когда митотическая активность клеток резко снижается. В пятой — *стационарной* — фазе ростовая кривая выходит на плато, число поделившихся клеток равно числу отмерших. В этот период начинается деградация клеток, однако она еще уравновешивается возрастанием числа клеток за счет их де-

ления; в целом же скорость нарастания клеточной массы равна нулю. После стационарной наступает фаза *отмирания* (деградации) клеток, во время которой число и масса живых клеток уменьшаются.

Культивируемые каллусные клетки и ткани сохраняют многие физиологические особенности, свойственные клеткам растения, из которого они были получены. Сохраняются, например, такие свойства, как морозостойкость, устойчивость к абиотическим факторам (температура, засоление, фотопериодическая реакция), а главное, хотя и в разной степени, — способность к синтезу вторичных метаболитов. Наряду с этими общими чертами, у каллусных клеток появляются свои, характерные только для них особенности. Например, длительно культивируемые *in vitro* клетки высших растений образуют специфическую популяцию соматических клеток, относящуюся к типу неполовых. Наиболее характерные свойства этой популяции — физиологическая асинхронность и генетическая гетерогенность.

Физиологическая асинхронность — важнейшее свойство неполовой популяции — заключается в том, что в каждый данный момент времени клетки находятся в разных фазах роста: одни делятся, другие растут, а третьи уже стареют. Поэтому общее физиологическое состояние такой популяции принято оценивать по состоянию большинства клеток. Причины возникающей асинхронности весьма разнообразны, в их числе:

- особенности вида, сорта, генотипа индивидуального растения, а также особенности экспланта;

- стрессы культивирования, например неоптимальная для данного вида клеток среда;

- изменение баланса эндогенных гормонов и концентрации в среде экзогенных гормонов в течение выращивания;

- генетическая гетерогенность клеток и клонов;

- аномалия митотического цикла клеток *in vitro*;

- физические факторы (температура, свет, аэрация).

Асинхронность — устойчивое свойство популяции каллусных клеток. Если с помощью специфических воздействий синхронизировать пролиферацию клеток популяции,

то уже через три-четыре деления она вновь становится асинхронной.

Генетическая гетерогенность — свойство клеток соматической популяции (нестабильность генома и их генетическая гетерогенность).

Генетически стабильными считаются только клетки меристематических тканей. В клетках остальных тканей при культивировании могут возникать полиплоидия, анеуплоидия, хромосомные аберрации, генные мутации. Однако генетическую гетерогенность нельзя рассматривать как недостаток, поскольку она является необходимым условием существования популяции клеток и служит основой для их адаптации.

В качестве причин появления генетической гетерогенности можно назвать следующие:

— генетическая гетерогенность исходного материала. В растениях клетки характеризуются различной ploидностью, диплоидны только активно делящиеся меристематические клетки;

— нарушение коррелятивных связей при выделении первичного экспланта из растения;

— действие компонентов среды. Экзогенные гормоны и стимуляторы могут оказывать мутагенное воздействие. Ауксины (особенно 2,4-Д), входящие в состав питательных сред, являются мутагенами; цитокинины способствуют полиплоидизации клеток;

— длительное субкультивирование, при котором накапливаются генетически измененные каллусные клетки.

После пяти-шести пересадок новый кариотип клеточной популяции, как правило, стабилизируется, если условия культивирования остаются постоянными. В противном случае изменение физических или трофических факторов приведет к новым генетическим изменениям.

Генетическая нестабильность каллусных клеток имеет большое значение для селекционной работы, так как позволяет отбирать штаммы клеток с измененным генотипом. Эти клетки могут обладать уникальными свойствами: повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам, повышенной продуктивностью и т. д. Однако генетическая

гетерогенность популяций каллусных клеток в культуре не влияет на сохранение в их геноме основных качеств вида и растения-донора.

Гормоннезависимость. Хотя гормоны и вызывают мутации, каллусные ткани большинства растений образуются только в присутствии в питательной среде и ауксинов, и цитокининов. Исключение составляют, например, незрелые зародыши пшеницы и семядоли подсолнечника. Первые образуют каллусную ткань на питательной среде с 2,4-Д, но без цитокининов, вторые, напротив, — на среде, содержащей цитокинины, но без ауксинов. По-видимому, такая специфика связана с эндогенным содержанием фитогормонов и с компетентностью клеток.

При длительном культивировании у каллусных тканей может возникать специфическое свойство гормоннезависимости, т. е. автономности, по отношению к ауксинам и цитокининам. Эти ткани могут расти на среде без гормонов, что делает их похожими на опухолевые клетки и резко отличает от нормальных каллусных тканей. Внешне же такие гормоннезависимые ткани ничем не отличаются от каллусных.

Клетки, которые в процессе культивирования приобрели свойство автономности от присутствия в среде гормонов, называют «привыкшими». Ткани, образованные такими «привыкшими» клетками, называют «химическими опухолями», в отличие от растительных или генетических опухолей.

Генетические опухоли возникают на межвидовых гибридах растений. Растительные опухоли имеют бактериальное или вирусное происхождение, чаще всего они возникают при попадании в растения агробактерий. Так, *Agrobacterium tumefaciens* вызывает образование корончатых галлов, *A. rhizogenes* — бородатого корня, *A. rubi* — стеблевого галла. Превращение растительных клеток в опухолевые связано с проникновением в них ДНК бактериальной клетки, так называемой Т-ДНК, которая значительно изменяет свойства клетки, в том числе экспрессирует гены, контролирующие синтез ауксинов и цитокининов.

Гормоннезависимость «привыкших» клеток связана с изменением активности собственных генов, ответственных

за синтез белков-ферментов, участвующих в синтезе гормонов. Таким образом, «привыкшим» тканям и растительным опухолям в равной степени свойственна гормоннезависимость, но у растительных опухолей она носит генетический характер. У «привыкших» клеток это свойство достигается главным образом за счет эпигеномных изменений.

Существует еще одна особенность, позволяющая отличить «привыкшие» и опухолевые клетки от обычных каллусных. Так, ни опухолевые, ни «привыкшие» ткани не способны к нормальной регенерации. Они могут образовывать уродливые органоподобные структуры, так называемые *тератомы*. В отдельных случаях у длительно культивируемых тканей удастся отодвинуть порог «привыкания» путем изменения состава питательных сред и добиться регенерации нормального растения.

В заключение следует сказать, что, как бы долго ни выращивались клетки в изолированной культуре, они «помнят» свое происхождение. Так, клетки моркови образуют зародыш целого растения моркови, клетки катарантуса розового — соответствующее растение и т. д.

Культивируемые клетки высших растений — это уникальная клеточная популяция, в которой каждая клетка представляет собой отдельный организм, способный к автономному развитию. При регулярном пассировании способность клеток к делению и росту может сохраняться очень долго. Известны ткани, которые поддерживаются в культуре *in vitro* по 60–70 лет.

3.6. Суспензионные культуры растений

Суспензионные культуры — это отдельные клетки или группы клеток, выращиваемые во взвешенном состоянии в жидкой среде (рис. 3.9, см. цв. вклейку). Они представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, которую легко подвергнуть воздействию химических веществ.

Суспензию клеток получают путем перенесения в жидкую среду каллусной ткани, предварительно выросшей на твердой агаризованной питательной среде. Поэтому первичная каллусная ткань, используемая в качестве посевного

материала, должна быть рыхлой и легко распадаться на отдельные клетки. Для отделения крупных агрегатов клеточную массу перед пересевом фильтруют или отстаивают, а затем помещают в жидкую среду с автоматическим перемешиванием.

В лабораторных условиях клетки суспензии выращивают в колбах на качалке. Скорость вращения 100–120 об/мин. В таких условиях обеспечивается аэрация тканей и нарастающая масса клеточных агрегатов распадается на отдельные фрагменты.

Необходимо отметить, что растительные клетки растут и размножаются значительно медленнее, чем клетки животных или микроорганизмов: время их удвоения составляет от одних до трех суток. Поэтому даже при суспензионном культивировании стационарная фаза роста клеток, при которой культура достигает максимума сухой биомассы, наблюдается обычно через две-три недели. Истощение питательной среды и накопление продуктов жизнедеятельности клеток определяют необходимость обновления культуральной среды или пересева культуры на свежую питательную среду.

Суспензионную культуру можно получать и непосредственно из первичного экспланта (лист, стебель, корень и т. д.). Для этого применяют ферменты, например пектиназу. Вначале на поверхности экспланта образуется каллусная ткань, а затем уже от нее отделяются клетки и клеточные агрегаты, в результате чего получается клеточная суспензия.

Для получения 100 мл клеточной суспензии требуется 2–3 г свежей каллусной ткани.

Обязательным условием культивирования клеточных суспензий является постоянное перемешивание или встряхивание среды. Если клеточная суспензия находится в неподвижном состоянии, то деление суспензионных клеток приводит к образованию каллусной ткани.

Деление суспензионных клеток поддерживается наличием в среде ауксинов и цитокининов, т. е. тех гормонов, которые необходимы для индукции и роста каллусных клеток. Суспензионные культуры представлены типичными

каллусными клетками, обладающими всеми свойствами, характерными для клеток такого рода.

Таким образом, как уже было отмечено выше, суспензии лучше образуются из рыхлого каллуса, получаемого на питательных средах с 2,4-Д. Исключение из питательной среды ионов кальция облегчает суспензирование. Еще более облегчает этот процесс добавление в питательную среду фермента пектиназы, которая разрушает пектат кальция, склеивающий отдельные клетки.

При промышленном культивировании суспензионных культур применяют закрытые или открытые системы с периодическим или проточным режимом выращивания клеток.

В *закрытой системе* клеточная суспензия лишена притока свежей питательной среды до конца выращивания (*периодическая культура*), а в случае *непрерывного режима* выращивания в *открытой системе* питательную среду частично меняют на свежую.

Как при периодическом, так и при проточном режиме выращивания в *открытой системе* клетки остаются в питательной среде и не удаляются даже при ее замене. Однако в открытых системах культивирования при замене питательной среды вместе со средой отбирается и часть суспензионных клеток.

Для работы с клеточными суспензиями необходимо знать их характеристики: жизнеспособность, плотность клеток в суспензионной культуре, степень агрегированности, скорость роста.

Жизнеспособность клеток определяют по их окрашиванию красителем (метиленовая синь, или синька Эванса). Живые клетки не окрашиваются красителем вследствие непроницаемости для него клеточных мембран. В мертвые клетки краска легко проникает, и они окрашиваются в синий цвет.

Одним из основных показателей, характеризующих состояние клеточной суспензии, является **плотность клеточной популяции**. Число клеток определяют в счетных камерах Фукса — Розенталя или Горяева под микроскопом после мацерации (разделения клеток) культуры. В качестве

мацерирующего вещества применяют 10–20% -ю хромовую кислоту, которая гидролизует срединные пластинки, соединяющие клетки.

Хорошо растущая суспензия имеет, как и каллусная культура, S-образную кривую роста. Обычно длительность пассажа составляет 14–16 дней. При этом плотность возрастает от 5×10^4 до 5×10^6 кл./мл. Суспензия для субкультивирования берется в конце экспоненциальной фазы. Увеличение числа клеток, их сырой и сухой массы — основные критерии роста суспензионных культур.

Качество суспензии зависит от степени агрегированности ее клеток (рис. 3.9). По степени агрегированности выделяют:

— *мелкоагрегированную* суспензионную культуру; состоит из одиночных клеток (40 %) и мелких агрегатов (60 %, агрегаты не должны содержать более 10–12 клеток);

— *среднеагрегированную* суспензионную культуру; состоит из одиночных клеток (40 %), мелких агрегатов (40 %) и крупных агрегатов (20 %, агрегаты содержат более 12 клеток);

— *крупноагрегированную* суспензионную культуру; состоит из мелких (40 %) и крупных (60 %) агрегатов. Чтобы избавиться от крупных агрегатов, суспензии фильтруют (фракционируют) через марлевые, нейлоновые или металлические фильтры. Одновременно это позволяет освободиться от остатков экспланта или плотных кусочков каллусной ткани.

Основными признаками хорошей суспензионной культуры служат ее высокая степень дезагрегации (5–10 клеток в группе), морфологическая однородность клеток (небольшие размеры, сферическая или овальная форма, плотная цитоплазма) и отсутствие дифференциации (в частности, трахеидоподобных элементов).

3.7. Изолированные протопласты

Изолированный протопласт — это содержимое растительной клетки, окруженное плазмалеммой (рис. 3.10). Целлюлозная стенка у данного образования отсутствует.



Рис. 3.10. Изолированные протопласты высших растений в условиях *in vitro*

Протопласт в целой клетке можно наблюдать во время плазмолиза.

Изолированные протопласты относятся к одним из наиболее ценных объектов в биотехнологии. Они позволяют исследовать различные свойства мембран, а также транспорт веществ через плазмалемму (рис. 3.11). Главное преимущество изолированных протопластов состоит в том, что в них достаточно легко вводить генетическую информацию из органелл и клеток других растений, прокариотических организмов и из клеток животных. Впервые термин «изолированные протопласты» был предложен в 1880 г. Д. Ханстейном.

Э. Коккинг установил, что изолированный протопласт, благодаря механизму пиноцитоза, способен поглощать из окружающей среды не только низкомолекулярные вещества, но и крупные молекулы, частицы (вирусы) и даже изолированные органеллы.

Большое значение в создании новых форм растений для изучения взаимодействия ядерного генома и геномов органелл имеет способность изолированных протопластов сливаться, образуя гибридные клетки. Таким способом



Рис. 3.11. Использование изолированных протопластов при изучении различных физиологических процессов (по Р.Г. Бутенко, 1999)

можно добиваться получения гибридов от растений с разной степенью таксономической удаленности, но обладающих ценными хозяйственными качествами.

Впервые протопласты были выделены Дж. Клернером в 1892 г. при изучении плазмолиза в клетках листа телореза (*Stratiotes aloides*) во время механического повреждения ткани. Поэтому данный метод назван **механическим**. Это длительный и трудоемкий метод, позволяющий выделять лишь небольшое количество протопластов (выделение возможно не из всех видов тканей).

Современный метод выделения протопластов, получивший название **ферментативного**, заключается в удалении клеточной стенки с помощью поэтапного использования для ее разрушения ферментов: целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы.

Первое успешное выделение протопластов из клеток высших растений ферментативным методом было осуществлено Э. Коккингем в 1960 г. По сравнению с механическим, этот метод имеет ряд преимуществ. Он позволяет сравнительно легко и быстро выделять большое число протопластов, причем они не испытывают сильного осмотического шока. После воздействия ферментов смесь протопластов пропускают через фильтр и центрифугируют для удаления неразрушенных клеток и их осколков.

Выделить протопласты можно из клеток растительных тканей, культуры каллусов и суспензионной культуры. Оптимальные условия для изоляции протопластов индивидуальны применительно к разным объектам, что требует кропотливой предварительной работы по подбору концентраций ферментов, их соотношения, времени обработки. Очень важным фактором, позволяющим выделять целые жизнеспособные протопласты, является подбор осмотического стабилизатора. В качестве стабилизаторов обычно используют различные сахара, иногда ионные осмотики (растворы солей CaCl_2 , MgHPO_4 , KCl). Концентрация осмотиков должна быть несколько гипертоничной, чтобы протопласты находились в состоянии слабого плазмолиза. В этом случае тормозятся метаболизм и регенерация клеточной стенки.

Изолированные протопласты можно культивировать. Обычно для этого используют те же питательные среды, на

которых растут изолированные клетки и ткани. Сразу же после удаления ферментов у протопластов в культуре начинается образование клеточной стенки. Протопласт, регенерировавший стенку, ведет себя как изолированная клетка, способен делиться и формировать клон клеток. Регенерация целых растений из изолированных протопластов сопряжена с рядом трудностей. Получить регенерацию через эмбриогенез удалось пока только у растений моркови. Стимуляцией последовательного образования корней и побегов (органогенез) добились регенерации растений табака, петунии и некоторых других растений. Следует отметить, что протопласты, изолированные из генетически стабильной клеточной культуры, чаще регенерируют растения, их с большим успехом применяют при исследованиях генетической модификации протопластов.

3.8. Морфогенез в клеточных культурах растений

Как уже говорилось, характерной особенностью растительных клеток является их тотипотентность, т. е. способность отдельной соматической клетки полностью реализовать свою программу развития и давать начало целому растительному организму.

Развитие многоклеточных организмов — одна из наиболее интересных, но сложных проблем в биологии. Большое распространение получило моделирование процессов онтогенеза на более простых системах: изолированных тканях, клетках и протопластах, культивируемых в стерильных условиях. Их преимущество состоит в том, что нет необходимости постоянно учитывать результаты взаимодействия органов в целостной системе растительного организма. Кроме того, экспериментатор сам имеет возможность выбирать, изменять и повторять условия опыта в соответствии с поставленной задачей.

После завершения дедифференцировки дальнейшее развитие каллусной клетки может идти разными путями.

Первый путь — это вторичная регенерация целого растения; возможна дифференцировка на уровне клеток, тканей, органов.

Второй путь — это утрата клеткой способности к вторичной дифференцировке и регенерации растения, стойкая дедифференцировка, приобретение способности расти на среде без гормонов, т. е. превращение в опухолевую. Такими свойствами часто характеризуются клетки старых пересадочных культур.

Третий путь — это нормальный цикл развития каллусной клетки, заканчивающийся ее старением и отмиранием. В этом случае клетка претерпевает вторичную дифференцировку и прекращает делиться (стационарная фаза роста). Однако такая дифференцировка не ведет к морфогенезу, а закрепляет за клеткой свойства старой каллусной клетки.

Наибольший интерес вызывает первый путь, фактически представляющий морфогенные процессы. В культуре каллусных тканей **морфогенезом** называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток.

Вторичная дифференцировка каллусной клетки может завершиться образованием в каллусной ткани отдельных дифференцированных клеток. Они имеют определенное строение и выполняют специфические функции. Примером служит образование *эпибластов* — клеток, в которых запасаются вторичные метаболиты (рис. 3.12, см. цв. вклейку). Это наиболее простой тип дифференцировки каллусной клетки. Более сложная гистологическая дифференцировка завершается образованием в каллусе различных тканей: млечников, волокон, трихом, элементов ксилемы (трахеи и трахеиды) и флоэмы (ситовидные трубки и клетки-спутницы). К самым сложным видам вторичной дифференцировки относятся *органогенез* (образование органов) и *соматический эмбриогенез* (образование из соматических клеток эмбриоидов — биполярных зародышеподобных структур).

Все эти типы дифференцировки возможны только благодаря свойству тотипотентности, поскольку любая растительная клетка содержит полный набор генов, характерный для того организма, из которого она была выделена. Потенциальные возможности всех клеток растения одинаковы. Каждая из них в определенных условиях может дать начало целому организму. Однако выяснено, что реально детер-

минируется только одна из 400–1000 клеток, что, вероятно, связано с физиологическим состоянием клетки, с ее компетентностью. Так, у эксплантов стеблевого происхождения компетентность к действию экзогенных фитогормонов (и, следовательно, способность к морфогенезу) проявляют только клетки эпидермальных и субэпидермальных тканей. Клетки могут приобретать ее в процессе культивирования каллусной ткани, в условиях, индуцирующих морфогенез. Время, в течение которого в каллусных клетках возникает это свойство, изменяется в широких пределах. Кроме того, существенную роль в дифференциации играют генотип растения-донора, условия и физические факторы культивирования.

Все каллусные клетки, готовые к вторичной дифференцировке, т. е. детерминированные, характеризуются общими чертами. Эти клетки (*клетки-инициали*) образуют утолщенную клеточную стенку, обособляясь от остальных каллусных клеток. Для них характерны более крупное ядро, высокое накопление запасных веществ, меньшие размеры вакуолей. В клетках-инициалах начинается синтез определенных белков, интенсифицируется пентозофосфатный путь расщепления гексоз. Очень важно, что между этими клетками, формирующими меристематические очаги, восстанавливаются плазмодесмы, которые практически отсутствуют в массе каллусных клеток.

Интересное предположение было высказано Л. Саксом и С. Тойвоненом (1963). Оно сводится к тому, что существует минимальная масса каллусных клеток, которая определяет способность уже детерминированных клеток к дальнейшему морфогенезу. Это подтвердилось в опытах с культурой семян ели, где детерминация адвентивных побегов происходила в клеточных комплексах из пяти-шести клеток. В случае развития соматических зародышей требовалось шесть — десять клеточных агрегатов.

Гистогенез. Главную роль в преобразовании каллусных клеток в сосудистые элементы играют фитогормоны, в основном ауксины. Опыты по изучению влияния апикальной меристемы побега (место синтеза ауксинов) на гистогенез в каллусной ткани показали, что ниже места прививки апек-

са в каллусной ткани начинали образовываться сосудистые элементы. Тот же эффект наблюдался при нанесении на каллус ауксина с сахарозой. Интересно, что повышение концентрации сахарозы способствовало образованию элементов флоэмы, а понижение — образованию ксилемных элементов. Причем такое воздействие оказывала совместно с ауксином только сахароза, что позволяет говорить о ее возможной регуляторной роли. Добавление к гормону других сахаров гистогенеза не вызывало. В некоторых случаях стимуляторами гистогенеза, помимо ауксинов, могут быть и другие фитогормоны. Так, было отмечено, что в каллусных тканях сои этот процесс начинается под воздействием гибберелловой кислоты и этилена.

Как уже отмечалось выше, в культурах *in vitro* существует два основных типа морфогенеза. Это **органогенез**, т. е. образование монополярной структуры (отдельных органов) — корневой, стеблевой, реже флоральной (цветочной) или листовой (рис. 3.13, см. цв. вклейку), и **соматический эмбриогенез**. При органогенезе сначала регенерируют отдельные органы, а затем уже из них — целые растения (исключение составляет корневой органогенез). При соматическом эмбриогенезе происходит образование биполярных зародышеподобных структур из соматических клеток (рис. 3.14, см. цв. вклейку). В этом случае, в отличие от органогенеза, сразу образуется зародыш, имеющий как меристему корня, так и меристему верхушечной почки, из которой в дальнейшем развивается целое растение.

Любая растительная клетка обладает одинаковыми потенциальными возможностями, так как содержит весь набор генов; следовательно, клетки сохраняют свойственную зиготе программу развития. Поэтому если получен каллус из клеток лепестка цветка, или из клеток сердцевинной паренхимы стебля, или из клеток любой ткани, то в принципе каждая такая клетка может регенерировать целое растение. Однако свойство тотипотентности не всегда реализуется, так как потенциальные возможности клеток разных типов проявляются неодинаково. В некоторых из них гены в большей степени репрессированы, в связи с чем проявление тотипотентности становится ограниченным.

Клеточную основу морфогенеза составляет *цитодифференцировка*. При этом дедифференцированные клетки вновь приобретают структуру и специализированные функции. Регенерация растения начинается с вторичной дифференцировки клеток.

Первые работы Ф. Скуга и С. Миллера показали прямую зависимость **органогенеза** в каллусах от соотношения фитогормонов — ауксина и открытого этими исследователями кинетина. Преобладание концентрации ауксина над цитокинином вызывает дифференцировку клеток, приводящую к образованию корневой системы. В этом случае регенерации целого растения не происходит. При увеличении концентрации цитокинина и уменьшении концентрации ауксина начинаются стеблевой органогенез и образование побега. Если его пересадить на свежую питательную среду с преобладанием ауксина, то наблюдаются образование корней и регенерация целого растения.

В настоящее время доказано, что для прохождения органогенеза очень большое значение имеют принадлежность растения-донора к классу двудольных или однодольных, его генотип, а также тип экспланта. Кроме того, морфогенез можно получить только при условии подбора оптимальной питательной среды, определенных физических факторов, при балансе фитогормонов, присутствии сигнальных белков и наличии белков-акцепторов в клетках.

Среди компонентов, входящих в состав питательных сред, существенную роль играют ионы NH_4^+ и NO_3^- . Присутствие аммонийного азота важно для начала морфогенеза, а добавление нитратного азота способствует росту и развитию образовавшихся структур. Фитогормоны, используемые для стимуляции органогенеза, не ограничиваются теперь только ауксинами и цитокининами. С этой целью в питательную среду вводят другие классы фитогормонов: абсцизины, гиббереллины, этилен.

Установлено также влияние типа экспланта на морфогенез. Например, экспланты, выделенные из верхних междоузлий растений, могут образовывать каллус, способный к флоральному морфогенезу, тогда как экспланты из нижних междоузлий давали начало только вегетативным органам.

Вопрос о механизме запуска вторичной дифференцировки у каллусных клеток остается открытым. В настоящее время самое раннее событие, связанное с морфогенезом, — это появление тканеспецифических белков. Установлено, что все морфогенетические изменения активируются и/или контролируются специальными генами.

Соматический эмбриогенез. При соматическом эмбриогенезе клетка-инициаль дает начало зиготе. Регенерант, образующийся из соматического зародыша, полностью сформирован, что делает лишними затраты на укоренение полученных при органогенезе побегов. Кроме того, соматические эмбриониды точнее воспроизводят генотип исходного растения, по сравнению с растениями-регенерантами, полученными в результате органогенеза. Соматические зародыши представляют и чисто практический интерес, так как их можно использовать для получения искусственных семян.

Соматический эмбриогенез очень важен для развития фундаментальных наук. Он позволяет изучать механизмы эмбриогенеза, так как почти все его фазы, за исключением первой, в растении и в культуре тканей совпадают. Наиболее ранняя из изученных фаз детерминации клетки по эмбриональному пути развития состоит в приобретении ею свойств полярности. Так, при определении плотности биоэлектрического потенциала для четырех морфогенных клеток оказалось, что максимальная плотность электрического тока была на полярных полюсах этой группы клеток. Переход клеток в следующую фазу эмбриогенеза сопровождался значительным повышением плотности тока. Предполагается, что морфогенные клетки могут поддерживать полярность за счет активного базипетального транспорта эндогенного ауксина, градиента биоэлектрических потенциалов и ионов кальция. Было также установлено, что слабый постоянный электрический ток (2 мкА) может быть индуктором эмбриогенеза.

Если органогенез можно индуцировать с помощью ауксинов или цитокининов, то соматический эмбриогенез фактически независим от экзогенных фитогормонов. Обычно эмбриогенные зоны возникают в каллусной ткани на той же питательной среде, которая использовалась для каллу-

сообразования. Развитие соматических зародышей в каллусной ткани начинается тогда, когда устраняется дедифференцирующий фактор из питательной среды (2,4-Д или другие ауксины). Развивающийся зародыш не нуждается в экзогенных гормонах, так как сам обеспечивает себя ими.

Независимость соматического эмбриогенеза от экзогенных гормонов является аргументом в пользу точки зрения, высказанной еще Г. Хаберландтом, а позднее Ф. Стэвардом: сам процесс изолирования клетки стимулирует реализацию ее тотипотентности, т. е. переход к морфогенезу.

Таким образом, основными стимулами морфогенеза в культуре каллусных тканей являются изменения соотношения гормонов в питательной среде и сам процесс изоляции растительной клетки от организма, а дополнительным стимулом — присутствие в питательной среде нитрата серебра, нитрата аммония, некоторых аминокислот (пролин, тирозин, иногда серин), полиаминов (путресцин и спермидин). В ряде случаев маннит и сорбит стимулируют процесс морфогенеза. Ионы NO_3^- оказывают влияние на развитие возникших в каллусной ткани организованных структур, а их индукцию стимулируют ионы NH_4^+ . Гибберелловая кислота способствует росту зачатков стебля, а абсцизовая — ускоряет дифференцировку органов соматических зародышей.

На регуляцию морфогенеза оказывает существенное влияние качество света. Показано, что морфогенный каллус чаще образуется на синем свете, чем на белом или красном.

Изменения на уровне индивидуальных белков во время реализации морфогенетической программы в культуре тканей позволили говорить о существовании белков развития. Однако отсутствие специфических тестов на эти белки делает их определение проблематичным. Вместе с тем при использовании гибридов, продуцирующих моноклональные антитела на мембранные белки соматических зародышей, удалось выявить полипептид с молекулярной массой 45 кДа, который встречается в ядре нескольких видов растений и, возможно, участвует в регуляции клеточного деления.

В настоящее время большое внимание уделяется генетическому аспекту морфогенеза — изучению соматического эмбриогенеза как генетически наследуемого признака. Роль

основного двигателя процесса развития отводится дифференциальной активности генов. Предполагается, что гены, контролирующие соматический эмбриогенез, начинают экспрессироваться в критические периоды развития эмбриоидов.

Для перестройки и подготовки инициальных клеток к последующим быстрым делениям, которые происходят при морфогенезе, требуется лаг-фаза, после которой клетки делятся по типу дробления, образуя сферическую массу мелких изодиаметрических клеток.

В случае органогенеза эту массу клеток называют **меристематическими очагами**, а в случае соматического эмбриогенеза — **глобулярным проэмбрио**.

В дальнейшем в меристематическом очаге дифференцируются зачатки стебля, корня, листа или цветочной почки и происходит соответственно стеблевой, корневой, листовой или флоральный органогенез.

В глобулярном проэмбрио развивается биполярная эмбрионидная структура.

Можно выделить несколько последовательных стадий формирования соматических эмбриоидов из каллусной клетки: **глобулярную, сердечка, торпедовидную, соматического зародыша** (рис. 3.15, см. цв. вклейку). Меристематические очаги или проэмбрио могут возникать на периферии каллусной ткани или быть погруженными в нее. Определенной закономерности в их локализации обычно не наблюдается.

3.9. Клональное микроразмножение растений и его практическое применение

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения — **клонального микроразмножения**: получения в условиях *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному экземпляру. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, т. е. под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму.

По сравнению с традиционными способами размножения, метод клонального микроразмножения, несомненно, имеет ряд преимуществ. Так, он обеспечивает:

- получение генетически однородного посадочного материала;
- получение безвирусных растений;
- высокий коэффициент размножения (10^5 – 10^6 — для травянистых и цветочных растений, 10^4 – 10^5 — для кустарниковых древесных, 10^4 — для хвойных);
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- автоматизацию процесса выращивания.

Начало успешному применению метода клонального микроразмножения было положено в конце 1950-х гг. французским ученым Ж. Морелем, которому удалось получить первые растения-регенеранты орхидей. Достижению успеха способствовала уже разработанная к тому времени техника культивирования апикальной меристемы растений в условиях *in vitro*.

В нашей стране работы по клональному микроразмножению были начаты в 1960-х гг. в лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН под руководством профессора Р.Г. Бутенко. Были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы, фрезии и некоторых других растений и предложены промышленные технологии.

Области применения клонального микроразмножения разнообразны, и имеются тенденции к их постоянному расширению. Это в первую очередь относится к размножению *in vitro* взрослых древесных пород, особенно хвойных, и использованию техники *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов лекарственных растений.

Процесс клонального микроразмножения можно разделить на *четыре этапа* (рис. 3.16):

- 1) выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- 2) собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества микропобегов;

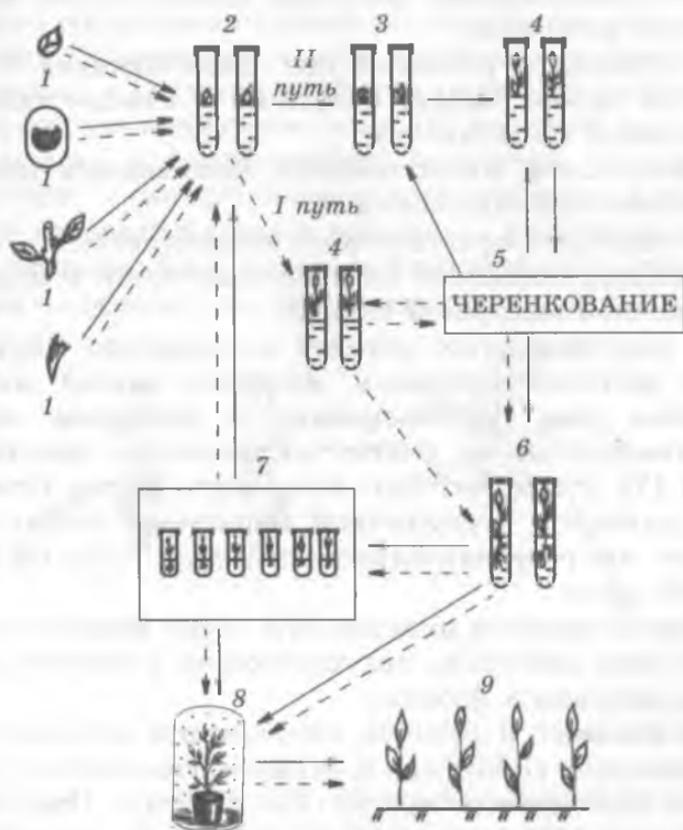


Рис. 3.16. Схема клонального микроразмножения растений методом активации развития существующих меристем (I путь) и индукция образования адвентивных почек на первичном экспланте (II путь)

- 1 — выбор исходного экспланта; 2 — получение стерильной культуры; 3 — образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте; 4 — рост почек и формирование микропобегов; 5 — размножение микропобегов (микрочеренкование); 6 — укоренение микропобегов; 7 — депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2 °C); 8 — перевод растений в тепличные условия; 9 — высадка растений-регенерантов в поле

3) укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2 °С, +10 °С);

4) выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Микроразмножение растений можно осуществлять следующими методами:

- активацией развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки и интеркалярные зоны стебля);

- индукцией возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;

- индукцией соматического эмбриогенеза;

- дифференциацией адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной тканях.

Из перечисленных методов клонального микроразмножения растений основным является **метод активации развития уже существующих в растении меристем**, основывающийся на снятии апикального доминирования (рис. 3.17). Это может быть достигнуто двумя путями:

- удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде;

- добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов.

Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин), а также 2-изопентениладенин (2ip) и зеатин. Полученные таким образом побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.

В настоящее время этот метод широко применяют в производстве безвирусного посадочного материала различных растений (рис. 3.18, см. цв. вклейку). Это сельскохозяйственные культуры — технические (сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стэхис), овощные (томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.); культуры промышленного цвето-

водства (гвоздика, хризантема, роза, гербера); тропические и субтропические растения (рододендрон, азалия, камелия, чай и др.); плодовые и ягодные культуры (яблоня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, крыжовник и др.); древесные растения (тополь, ива, ольха, береза, рябина, секвойя, туя, можжевельник и др.). Для некоторых сельскохозяйственных культур (таких, как картофель) технология клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. Применение метода активации развития уже существующих в растении меристем позволяет получать из одной меристемы картофеля более 10^5 растений в год, причем технология предусматривает получение в пробирках микроклубней — ценного безвирусного семенного материала.

Второй из перечисленных методов — *индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта* — основан на способности изолированных частей

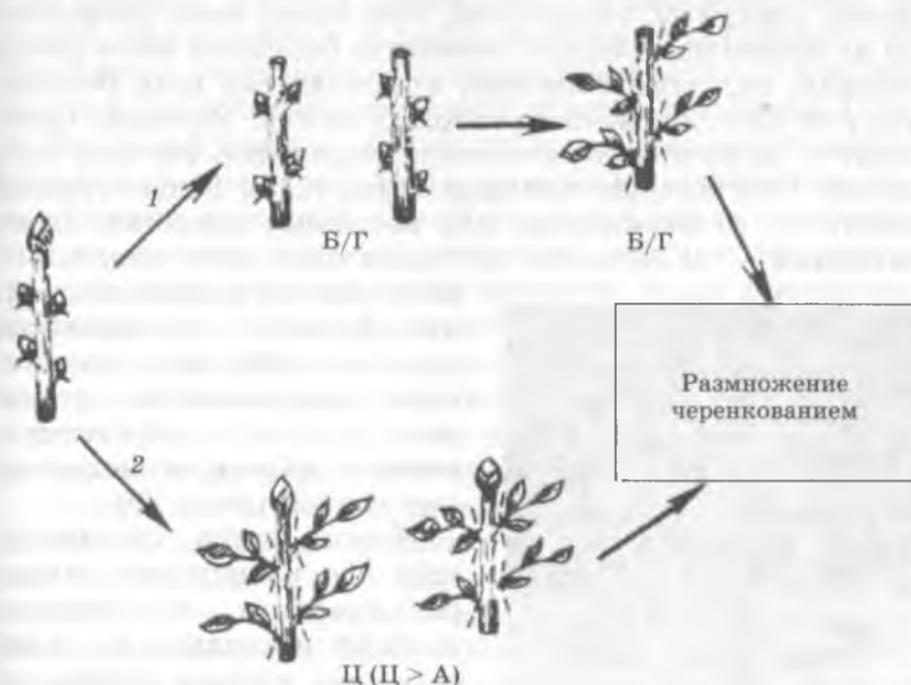


Рис. 3.17. Схема размножения растений методом активации развития существующих меристем: 1 — удаление верхушечной меристемы; 2 — добавление в питательную среду цитокининов (Б/Г — безгормональная среда; Ц — цитокинины; А — ауксины)

растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и таким образом регенерировать целые растения (рис. 3.19, см. цв. вклейку). Образования адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий), если их удастся получить свободными от инфекции. Этот процесс, как правило, происходит на питательных средах, содержащих один цитокинин или в его сочетании с ауксином (в соотношении 10 : 1 или 100 : 1). В качестве ауксина в этом случае наиболее часто используют β -индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) или α -нафтилуксусную кислоту (НУК).

Индукция возникновения адвентивных почек — наиболее распространенный метод микроразмножения высших растений: многие луковичные цветочные растения (нарциссы, лилии, гиацинты, гладиолусы, тюльпаны) были размножены из луковичных чешуек, сегментов базальной части донца луковиц, эксплантов листьев; представители рода *Brassica* (капуста цветная, кочанная, брюссельская, листовая, брокколи) — из сегментов гипокотыля, семядолей, листьев; лук, чеснок — из верхушечной меристемы, ткани донца луковиц; томаты — из апикальных или пазушных меристем; салат цикорный — из сегментов листовых пластинок; петуния —



Рис. 3.20. Микроразмножение сосны из изолированных зародышей в условиях *in vitro*

из сегментов корней; глоксиния, фиалки — из сегментов листовых пластинок; некоторые представители древесных растений — из изолированных зрелых и незрелых зародышей (рис. 3.20).

Третий метод, практикуемый при клональном микроразмножении, основывается на *дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур*, которые по своему внешнему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил

название **соматического эмбриогенеза**. Основное отличие образования зародышей *in vitro* от *in vivo* (в естественных условиях) заключается в том, что соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по своему внешнему виду напоминают биополярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апикальных меристем стебля и корня. В настоящее время этот метод используется для размножения большинства растений из семейства *Orchidaceae* и *Rutaceae*, некоторых представителей злаковых (пшеница, ячмень), люцерны, редиса, винограда, а также некоторых видов древесных пород (осина, эвкалипт, дуб, ель обыкновенная).

Формирование эмбриоидов в культуре тканей происходит в две стадии. На первой стадии клетки экспланта дифференцируются за счет добавления в питательную среду ауксинов (как правило, 2,4-Д) и превращаются в эмбриональные. На второй стадии клетки должны развиться в эмбриоиды, что достигается уменьшением концентрации ауксина или полным его исключением из состава питательной среды. Соматический эмбриогенез можно наблюдать непосредственно в тканях первичного экспланта, а также в каллусной культуре. При этом последний способ считается менее пригодным при клональном микроразмножении, так как посадочный материал, полученный таким методом, будет генетически нестабилен по отношению к растению-донору. Как правило, соматический эмбриогенез происходит при культивировании каллусных клеток в жидкой питательной среде (суспензии) и является наиболее трудоемким, так как не всегда удается реализовывать свойственную клеткам тотипотентность.

Однако данный метод размножения имеет свои преимущества, поскольку не требуется подбора специальных условий укоренения и адаптации пробирочных растений, так как соматические зародыши представляют собой полностью сформированные растеньица. При использовании соответствующей техники их капсулирования из этих эмбриоидов возможно получать искусственные семена.

Четвертый метод клонального микроразмножения — **дифференциация адвентивных почек в первичной и посадочной каллусной ткани** — мало используется для по-

лучения посадочного материала *in vitro*. Это связано с тем, что при периодическом пересаживании каллусной ткани на свежую питательную среду часто наблюдаются явления, нежелательные при микроразмножении: изменение ploидности культивируемых клеток, структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций, потеря морфогенетического потенциала культивируемыми клетками. Наряду с генетическими изменениями растений наблюдаются и морфологические: низкорослость, неправильное жилкование листьев и их расположение по стеблю, образование укороченных, утолщенных междоузлий, уродливость, пониженная устойчивость к болезням и вредителям. Причем длительное культивирование каллусных клеток усугубляет эти изменения, поэтому период неорганизованного роста при микроразмножении должен быть сведен к минимуму.

Несмотря на некоторые недостатки, метод дифференциации адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани имеет положительные стороны:

— во-первых, он эффективен и экономически выгоден, так как в процессе размножения из каждой индивидуальной каллусной клетки при благоприятных условиях культивирования может сформироваться адвентивная почка, дающая начало новому растению;

— во-вторых, в ряде случаев он является единственно возможным методом размножения растений в культуре тканей;

— в-третьих, он представляет большой интерес для селекционеров, так как растения, полученные методом дифференциации адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани, различаются генетически и морфофизиологически. Это дает возможность селекционерам проводить отбор растений по хозяйственно важным признакам и оценивать их интродукцию в полевых условиях.

Метод дифференциации адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани целесообразно применять лишь к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, а вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. К таким растениям можно отнести амариллис, томаты, спаржу, некоторые древесные породы и

другие культуры. Через каллусную культуру были размножены сахарная свекла, некоторые представители рода *Brassica*, кукуруза, рис, пшеница и другие злаковые, подсолнечник, лен; разработаны условия, способствующие регенерации растений из каллуса огурца, картофеля, томатов.

Основное преимущество клонального микроразмножения заключается в возможности получения генетически однородного, безвирусного посадочного материала. Этого достигают, используя меристематические ткани апексов и пазушных почек органов стеблевого происхождения. Как правило, меристема состоит из конуса нарастания, а также одного или двух листовых зачатков (примордиев) и является свободной от инфекции.

Предположение о возможности отсутствия вирусов в меристематических тканях больных растений впервые высказано Ф. Уайтом (1943). Начиная с 1950-х гг. были предприняты первые успешные опыты по получению свободных от вирусов растений георгина из точки роста. Авторы этого метода Ж. Морель и С. Мартин полагали, что в больном растении вирус распространяется с отставанием от быстро растущих молодых органов, особенно в молодых недифференцированных тканях, где концентрация вируса может снижаться, вплоть до полного отсутствия. Теоретические концепции, положенные в основу этого метода, нашли свое подтверждение в последнее время.

Структурной основой используемого на практике явления служит специфика строения точки роста растений; дистальная ее часть, представленная апикальной меристемой, у разных растений имеет средний диаметр до 200 мкм и высоту от 20 до 150 мкм. В более нижних слоях дифференцирующиеся клетки меристемы образуют прокамбий, дающий начало пучкам проводящей системы.

Известно, что успех клонального микроразмножения зависит от размера меристематического экспланта: чем больше листовых зачатков и тканей стебля, тем легче идет процесс морфогенеза, заканчивающийся получением целого нормального пробирочного растения.

Вместе с тем зона, свободная от вирусных частиц, существенно различается для разных видов и сортов растений, а

также зависит от вида вирусов. В колеоптиле злаков, например, размеры участка верхушки, не содержащей сосу-ды, могут достигать до 250 мкм. Такая особенность строения апикальной меристемы исключает проникновение в нее вируса путем быстрого транспортирования по проводящей системе, но допускает возможность его медленного распространения через плазмодезмы, соединяющие меристематические клетки.

При культивировании апикальной меристемы картофеля величиной 200 мкм на питательной среде и дальнейшем получении из нее растений-регенерантов было показано, что среди полученных растений только 10 % были свободны от X-вируса, но 70 % — от Y-вируса.

Применение электронной микроскопии часто обнаруживает наличие вирусов в меристеме пораженных ими растений, что, впрочем, подтверждает общеизвестный факт: число лишенных вируса растений после подобной операции чрезвычайно мало и многие меристемы пораженных растений инфекционны.

Таким образом, эффективность применения апикальной меристемы в качестве метода оздоровления зараженных вирусами растений оказывается низкой. Это было доказано результатами, полученными рядом меристемных лабораторий Российской Федерации и Крыма, а именно: из апикальных меристем растений гвоздики, цимбидиума, пораженных вирусами CarMV и CarVMV, в условиях *in vitro* получают инфицированные мериклоны.

В принципе возможно получение безвирусной апикальной меристемы от больного растения, но при этом риск попадания вирусов в здоровые ткани должен быть снижен до нуля. Этого можно достичь путем применения методов предварительной термо- или хемотерапии исходных растений.

Метод термотерапии — использование сухого горячего воздуха — применяют как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro*. Для объяснения механизма освобождения растений от вирусов в процессе термотерапии существуют различные гипотезы.

Согласно одной из них, высокие температуры воздействуют непосредственно на вирусные частицы через их рибонук-

леиновую кислоту и белковую оболочку, вызывая физическое разрушение и лишая вирусные частицы вирулентности.

Вторая гипотеза состоит в том, что высокая температура воздействует на вирусы через метаболизм растений. Под влиянием высоких температур нарушается равновесие между синтезом и деградацией вирусных частиц. Если преобладает синтез, то концентрация вируса в зараженных тканях растет, и наоборот.

Растения, подвергающиеся термотерапии, помещают в специальные термокамеры (термостат), где в течение первой недели повышают температуру от 25 до 37 °С путем ежедневного увеличения параметров температур на 2 °С. Не менее важно при термотерапии создавать и поддерживать на протяжении всего процесса оптимальные режимы: температуру — 37 °С; освещенность лампами дневного света — 5 тыс. лк; фотопериод, в зависимости от культуры, — 14–16 ч в сутки при относительной влажности воздуха в термокамере 90 %.

Продолжительность термотерапии всецело зависит от состава вирусов и их термостойкости. Если, например, для гвоздики достаточно 10–12-недельного воздействия теплом, то для освобождения хризантемы от Б-вируса этот период длится 12 и более недель. Однако существуют растения (например, луковичные культуры, цимбидиум, розы и др.), рост которых угнетается в результате длительной термотерапии *in vivo*. Для таких растений целесообразно проводить термотерапию растений-регенерантов *in vitro*.

Помимо положительного воздействия термотерапии на освобождение растений от вирусов, выявлен положительный эффект высоких температур на точку роста и процессы морфогенеза некоторых цветочных культур (гвоздика, хризантема, фрезия) в условиях *in vitro*. Применение термотерапии позволяет увеличить коэффициент размножения на 50–60 %, повысить адаптацию пробирочных растений-регенерантов к почвенным условиям, а также получить более высокий процент безвирусных маточных растений.

Применение термотерапии в сочетании с меристемной культурой позволяет оздоровить от вирусного хлороза более 70 % растений-регенерантов хмеля, 90 % — земляники,

25 % — черной и красной смородины, 50 % — малины, более 80 % — картофеля.

Проверку растений на наличие вирусов, как правило, проводят с помощью иммуноферментного анализа, электронной микроскопии и травянистых растений-индикаторов.

Второй метод освобождения растений от вирусов — **хемотерапия** — заключается в добавлении в питательную среду, на которой культивируют апикальные меристемы, аналога гуанозина — 1 β -Д-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоскимид (коммерческое название — **вирозол**) в концентрации 20–50 мг/л. Это противовирусный препарат широкого спектра действия. При использовании вирозола в культуральной среде процент безвирусных меристемных растений увеличивался до 80–100 %. Положительные результаты хемотерапии были получены для сливы, черешни, малины, некоторых цветочных и других растений.

Термо- и хемотерапевтические методы оздоровления посадочного материала от вирусов экономически малоэффективны. Поэтому в настоящее время с помощью методов **трансгеноза** создают формы растений с генетической устойчивостью к вирусам.

3.10. Методы клеточной инженерии растений в ускорении селекционного процесса

Одно из направлений клеточных технологий — использование их в селекции для облегчения и ускорения традиционного селекционного процесса по созданию новых форм и сортов растений. Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей *in vitro* условно можно подразделить на две группы.

Первую группу составляют **вспомогательные технологии**, которые не подменяют обычную селекцию, а служат ей. К ним можно отнести: оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости); культивирование семян почек и незрелых гибридных зародышей (преодоление постгамной несовместимости); получение гаплоидных растений путем культивирования пыльников и микроспор; клональное микроразмножение отдаленных гибридов.

Вторую группу составляют **основные методы**, которые ведут к самостоятельному, независимому от традиционных методов селекции получению новых форм и сортов растений на основе соматической гибридизации, слияния изолированных протопластов, клеточной селекции и других методических подходов.

Вспомогательные методы *in vitro* в селекции растений

Оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости) проводят при невозможности осуществить оплодотворение между wybranными парами растений в естественных условиях. Необходимость применения может быть вызвана как физиологическими (несоответствие во времени созревания пыльцы и т. п.), так и морфологическими (короткая пыльцевая трубка или блокирование ее роста на разных этапах развития и т. п.) причинами.

Оплодотворение *in vitro* можно осуществить культивированием завязи с нанесенной на нее готовой пыльцой на искусственной агаризованной питательной среде.

Визуально определить, прошло оплодотворение *in vitro* или нет, можно по быстро увеличивающимся в размерах семечкам. Сформировавшийся зародыш, как правило, не переходит в состояние покоя, а сразу прорастает и дает начало гибридному поколению.

Плацентарное оплодотворение *in vitro* позволило преодолеть несовместимость в скрещивании сортов культурного табака *N. tabacum* с дикими видами *N. rosulata* и *N. debneyi* и сделало возможным получение межвидовых гибридов табака.

Преодоление постгамной несовместимости. Постгамная несовместимость при отдаленной гибридизации возникает после оплодотворения. Часто при этом образуются щуплые невсхожие семена. Причиной может быть расхождение во времени развития зародыша и эндосперма. Из-за слабого развития эндосперма зародыш становится неспособным к нормальному прорастанию. В таких случаях из зерновки изолируют зародыш и выращивают его в питательной среде. Данный способ выращивания называется **эмбриокультурой**. Питательная среда для выращивания может

быть простой, без добавок физиологически активных веществ (например, среда Уайта) или любой другой, содержащей минеральные соли и сахарозу.

При отдаленных скрещиваниях уже на ранних этапах могут наблюдаться нарушения в развитии зародыша, что выражается в отсутствии дифференцировки, замедленном росте. В этом случае рост культур зародыша состоит из двух этапов — эмбрионального роста зародыша, во время которого продолжается его дифференцировка, и прорастания подросшего зародыша. Для первого этапа требуется более сложная по составу питательная среда: с повышенным содержанием сахарозы, с добавками различных аминокислот, витаминов и гормонов.

Применение метода эмбриокультуры в селекции приобретает в последнее время большое значение для получения отдаленных гибридов зерновых, злаковых и других сельскохозяйственных культур. Показана возможность увеличения выхода пшенично-ржаных гибридов путем дорастивания незрелых зародышей, а также использования эмбриокультуры для преодоления постгамной несовместимости при гибридизации пшеницы с колосняком.

Метод эмбриокультуры находит все более широкое применение в межвидовой гибридизации овощных растений. Для лука разработаны приемы выращивания *in vitro* абортивных зародышей из гибридных семян с разных этапов эмбриогенеза, а также приемы выращивания зародышей от частично фертильных межвидовых гибридов. Культуру изолированных зародышей используют в селекции томатов и других овощных растений.

Этот вспомогательный метод применяют не только при отдаленной гибридизации, но и для преодоления постгамной несовместимости, а также с целью микроразмножения ценных гибридов. В этом случае микроразмножение идет путем каллусогенеза, индукции морфогенеза и получения растений-регенерантов из каллусной ткани. Техника клонирования незрелых зародышей позволяет размножать ценные генотипы растений на ранних стадиях жизненного цикла. Еще одна возможность применения культуры зародышей — использование ее в клеточной селекции.

Клональное микроразмножение отдаленных гибридов. Эмбриокультура дает возможность вырастить гибридные растения из неполноценных зародышей. Однако выход гибридных растений мал и гибриды часто бывают стерильны. Иногда, например при селекции гречихи, трудно воспроизвести в потомстве уникальные генотипы из-за перекрестного опыления культуры. Поэтому перед исследователями часто встает задача размножить и сохранить полученные растения. В этом помогает метод клонального микроразмножения. Размножают гибриды путем активации развития меристемы пазушных почек (черенкованием стерильных побегов), адвентивными почками или регенерацией растений из каллусной ткани, в частности полученной при культивировании зародышей.

Получение гаплоидных растений *in vitro* и использование их в селекции. Роль гаплоидных растений в селекции очень велика. Их применение позволяет быстрее найти нужную комбинацию, сокращает время для создания сорта. Гаплоидные растения используют для получения стабильных гомозиготных линий. Для мутагенеза также удобнее использовать гаплоиды, поскольку на гаплоидном уровне облегчается отбор рецессивных мутаций.

В диплоидных растениях мутации редко затрагивают оба аллельных гена в гомологичных хромосомах. Особь обычно гетерозиготна (два гена различаются), при этом проявляется действие только доминантного (но не рецессивного) гена. Поскольку мутации чаще рецессивны, чем доминантны, их довольно сложно выявить. В гаплоидных же растениях, которые содержат только одну из каждой пары гомологичных хромосом, мутации проявляются немедленно. Селекция на гаплоидном уровне позволяет вести прямой отбор не только доминантных, но и рецессивных признаков.

Гаплоидные особи стерильны, но можно искусственно удвоить набор их хромосом с помощью колхицина и получить диплоидные гомозиготные растения.

Гаплоиды могут возникать спонтанно, но частота их спонтанного возникновения очень мала. Искусственным путем с использованием методов *in vitro* удается получить большие количества гаплоидных растений.

Существует *три способа получения гаплоидов* с использованием метода культуры изолированных тканей:

— *андрогенез* — получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор;

— *гиногенез* — получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семязачек;

— *партеногенез* — получение гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы.

Гаплоидные эмбриониды, образовавшиеся в результате элиминации хромосом отцовского генома, культивируют на искусственных питательных средах и получают гаплоидные растения.

Возможны два пути образования гаплоидных растений *в культуре пыльников*:

— *образование растений путем эмбриогенеза в пыльцевых зернах*. При этом внутри пыльников из отдельных пыльцевых зерен возникают эмбриониды. Они прорастают и дают гаплоидные растения;

— *образование каллуса из клеток пыльника*. В дальнейшем в результате морфогенеза из каллусных клеток регенерируют растения. В этом случае образовавшиеся растения не всегда бывают гаплоидными и часто отличаются по пloidности. До конца не выяснено, образуются ли они от полиплоидизированных гаплоидных клеток или от слившихся клеток.

Гаплоиды, полученные *in vitro*, можно применять не только в практической селекции, но и в генетической инженерии, в клеточной селекции. Пыльцевые зерна являются в некоторых случаях более удобными, чем протопласты, объектами для опытов по генетической трансформации.

Основные методы *in vitro* в селекции растений

Соматическая гибридизация — создание неполовых гибридов путем слияния изолированных протопластов, полученных из соматических клеток. Этот метод позволяет скрещивать филогенетически отдаленные виды растений,

которые невозможно скрестить обычным половым путем; вызывать слияние трех и более родительских клеток; получать асимметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей, наряду или с несколькими хромосомами или генами, или только с органеллами и цитоплазмой другого родителя. Гибридизация соматических клеток дает возможность не только соединить в одном ядре гены далеких видов растений, но и сочетать в гибридной клетке цитоплазматические гены партнеров.

Выделение, культивирование и слияние изолированных протопластов. Для применения методов соматической гибридизации необходима разработка соответствующих технологий получения протопластов, способных делиться и регенерировать растения.

Для культивирования протопластов применяют те же питательные среды, что и для культуры изолированных клеток и тканей. Отличительной чертой питательных сред для протопластов является повышенное осмотическое давление на начальных этапах культивирования, которое обеспечивается высокой концентрацией маннита или CaCl_2 . В процессе культивирования изолированные протопласты регенерируют новую клеточную стенку (через 48 ч с момента выделения протопластов) и превращаются в клетки, способные делиться и давать начало образованию каллусной ткани. Протопласты выделяют из каллусных, суспензионных клеток или из клеток листьев, меристем, стеблей. При выделении протопластов из листьев сначала удаляют эпидермис, лист нарезают на сегменты и затем подвергают энзиматической обработке пектиназой и целлюлозой.

Слияние изолированных протопластов может происходить спонтанно, но это случается довольно редко. Индуцированное слияние изолированных протопластов впервые было получено в лаборатории Э. Коккина в 1970 г. В качестве индуктора служил нитрат натрия. Но этот метод оказался малоэффективным, и сейчас найдены другие фьюзогены (индукторы слияния). Наиболее эффективными из них оказались растворы с высоким рН (9–11) и высокой концентрацией ионов кальция (100–300 мМ). Протопласты предварительно агглютинируют с помощью концентриро-

ванных растворов полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500–6000. У. Циммерман с сотрудниками разработали физический метод слияния протопластов животных клеток, липосом, в котором в качестве индуктора использовались импульсы электрического тока.

Слияние протопластов приводит к образованию либо *цибрида*, либо *гибрида*. Цибридная клетка содержит цитоплазму обоих партнеров, а ядро — одного. Это возможно, если после слияния протопластов не происходит соединения ядер и одно ядро дегенерирует. Образование цибрида возможно и в том случае, если один из протопластов лишен ядра или оно инактивировано путем облучения. Цибридизация позволяет ввести цитоплазматические гены, несущие признаки ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности), устойчивости к некоторым гербицидам и патогенам.

Гибриды были получены при слиянии протопластов эритроцитов крысы и протопластов дрожжевых клеток, протопластов моркови и человека, табака и человека и др.

Первый неполовой межвидовой гибрид высших растений был получен в 1972 г. путем слияния изолированных протопластов двух видов табака: *Nicotiana glauca* и *N. langsdorfii*.

В настоящее время получено большое число межвидовых, межсемейственных и межтрибных гибридов методом парасексуальной гибридизации. Однако во многих случаях гибридные растения, полученные этим методом, в той или иной степени аномальны. Примером может служить соматический гибрид арабидопсиса и турнепса, который является растением-монстром. Аномалии возникают как результат хромосомной несбалансированности.

Для идентификации гибридов могут быть использованы пластиды (протопласты). Например, при слиянии протопластов табака и моркови в качестве селективных маркеров использовали зеленые хлоропласты табака и красно-оранжевые хромопласты моркови.

Применение изолированных протопластов в селекции растений не ограничивается возможностью их индуцированного слияния и получения соматических гибридов. Изолированные протопласты способны поглощать из окружающей среды макромолекулы и органеллы; следовательно, в них

можно вводить чужеродную информацию, не пересаживая ДНК или органеллы других клеток. Уже проведена успешная трансплантация изолированных ядер в протопласты петунии и табака. Вместе с тем поглощение протопластами чужеродных ядер не всегда ведет к образованию гибридов. Кроме ядер, в изолированные протопласты удалось трансплантировать чужеродные хлоропласты и получить растения-регенеранты.

Однако работы по переносу чужеродных органелл и ДНК только начинают развиваться. В целом использование изолированных протопластов в генетической реконструкции клетки открывает новые перспективы перед клеточной селекцией.

Одна из наиболее сильных сторон культуры *in vitro* — создание технологий для сельского хозяйства на основе следующих методов клеточной селекции:

— *прямая (позитивная) селекция*, при которой выживает лишь определенный искомый мутантный тип клеток;

— *непрямая (негативная) селекция*, основанная на избирательной гибели неустойчивых делящихся клеток, но требующая дополнительной идентификации у них мутационных изменений;

— *тотальная селекция*, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны;

— *визуальная селекция и неселективный отбор*, когда вариантная линия может быть идентифицирована среди всей популяции клеток визуально или при использовании биохимических методов (тонкослойная или жидкостная хроматография, радиоиммунный анализ, микроспектрофотометрия и др.).

Наиболее распространен метод прямой селекции. Он применяется главным образом для выделения растений-регенерантов, устойчивых, например, к гербицидам, антибиотикам, токсинам, тяжелым металлам, солям и другим антиметаболитам.

Для проведения работ по клеточной селекции растений в условиях *in vitro* в качестве объекта исследования могут быть использованы каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты. Выбор объекта зависит от нали-

чия разработанных технологий применительно к различным видам растений, а также от конечных целей исследования.

Каллусная ткань представляет собой легко доступный материал, который наиболее часто используют для клеточной селекции. Как правило, работу проводят на первичной или пересадочной каллусной ткани, которая не утрачивает способности к регенерации на протяжении ряда субкультивирований.

Вместе с тем многие исследователи, работающие с каллусными культурами, отмечают существенные недостатки данного объекта: медленный рост ткани; неравноценное для всех клеток воздействие токсических веществ, применяемых в качестве селективного фактора; потеря регенерационной способности в процессе культивирования каллусных клеток.

Несомненно, проводить селекцию целесообразно на уровне одиночных клеток (суспензионная культура или протопласты). Однако для многих видов растений не разработаны эффективные технологии и способы культивирования одиночных клеток. Поэтому, несмотря на перечисленные недостатки, с которыми сталкиваются исследователи при использовании каллусных культур, этот способ селекции остается для некоторых видов растений пока единственным.

Получение стабильно устойчивых линий — процесс длительный. Как правило, селекция начинается с получения из изолированных растительных эксплантов достаточного количества каллусной массы, которая в дальнейшем используется для определения такой концентрации селективного фактора (построение дозовой кривой), при которой наблюдается рост каллусной ткани и одновременно погибает часть каллусных колоний. Выбранная концентрация селективного фактора признается оптимальной и используется в дальнейших экспериментах.

Так как первично полученные на средах с селективными факторами колонии клеток могли возникнуть вследствие физиологической адаптации или определенного состояния дифференцировки клеток и могут быть генетически неустойчивыми, то в течение последующих четырех — шести субкультивирований на селективной среде проверяется стабильность устойчивости полученных клонов. Затем

их переносят на питательную среду без селективного фактора и субкультивируют еще два-три пассажа. И только после повторного возвращения в селективные условия отбирают стабильные клоны, из которых пытаются получить растения-регенеранты.

Однако работы, проведенные с получением растений, устойчивых к повышенным концентрациям солей, а также к токсинам, выделенным из грибов — возбудителей болезней, показали, что устойчивость клетки и растения к исследуемому селективному фактору может совпадать и не совпадать. Прямая корреляция между устойчивостью растений и клеток *in vitro* отмечена лишь для низких температур, для устойчивости к гербицидам, к высоким концентрациям алюминия и другим факторам.

Большое число работ по культивированию каллуса с целью получения нового селекционного материала проведено на пшенице, ячмене, рисе, сорго, а также на картофеле, томатах, люцерне. Уже достигнуты первые положительные результаты по получению растений пшеницы, риса, картофеля, устойчивых к NaCl. Получены клетки моркови, а из них — растения, которые, благодаря добавлению в питательную среду токсичных аналогов аминокислот, синтезируют в 20 раз больше метионина, в 30 раз больше — триптофана, в пять раз больше — лизина. Для картофеля получены растения, устойчивые к кольцевой гнили. Что касается древесных растений, то работы в этом направлении крайне редки и часто носят поисковый характер.

Дальнейшее использование каллусной культуры в селекционных целях открывает огромные возможности в создании новых форм растений, несущих ценные для человечества признаки.

Наряду с перечисленными выше объектами (каллусные и суспензионные культуры, изолированные протопласты), в качестве исходного материала для селекции могут быть использованы культуры соматических или андрогенных эмбриоидов, такие органогенные экспланты, как сегменты листьев или различные меристематические и стеблевые части растений, а также культура изолированных зародышей. Например, путем культивирования и селекции *in vitro* зародышей

из семян получены растения ячменя, устойчивые к аналогам аминокислот и с улучшенным содержанием белка. Для картофеля разработан эффективный метод обработки побегов и черенков мутагеном, приводивший к получению химерных мутантов хлорофиллдефектности и антибиотикоустойчивости. При культивировании пыльников яровой пшеницы сортов Саратовская 29 и Московская 35 на питательных средах с повышенным содержанием солей хлорида натрия получены соматические эмбриониды, а в дальнейшем — растения-регенеранты, проявившие повышенную солеустойчивость.

Таким образом, проведение селекции на клеточном уровне позволяет создавать новые формы растений в два — четыре раза быстрее по сравнению с традиционными способами.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Расскажите о клеточной инженерии растений и ее целях.
2. Что означает термин *in vitro*?
3. Перечислите основные этапы развития биотехнологии.
4. Что означает термин «тотипотентность клеток»?
5. Каков вклад Х. Фёхтинга, К. Рехингера и Г. Хаберландта в развитие биотехнологии?
6. Какие ученые разработали методы культивирования клеток растений в условиях *in vitro*?
7. В каком году и кем были открыты цитокинины? Какова природа этих веществ?
8. Кто является основоположником метода клонального микро-размножения растений?
9. Перечислите основные направления использования культур изолированных клеток и тканей растений в биотехнологии.
10. Что является основной формой существования жизни?
11. Расскажите о главных отличиях прокариотических и эукариотических клеток.
12. Какие существуют гипотезы о возникновении эукариотической клетки?
13. Какой процесс определяет формирование каллусной ткани растений?
14. Какую роль выполняют ауксины и цитокинины при каллусогенезе?
15. Что происходит с клетками и тканями растений в процессе их дедифференциации?

16. Дайте определение каллусной ткани.
17. Какие существуют типы каллусных тканей?
18. Перечислите основные фазы роста клеток и расскажите о каждой из них.
19. Какие физиологические особенности, свойственные клеткам растения, сохраняются в условиях *in vitro*?
20. Расскажите о физиологической асинхронности клеточных культур растений.
21. Каковы причины генетической гетерогенности культур в системе *in vitro*?
22. Что такое гормонезависимость клеточных культур растений?
23. Дайте определение суспензионным культурам клеток.
24. Какие основные условия требуются для культивирования клеточных суспензий?
25. Перечислите степени агрегированности клеток, встречающиеся в суспензионных культурах, и расскажите об их особенностях.
26. Что такое изолированные протопласты? Кем и когда был предложен этот термин?
27. Кто впервые выделил изолированный протопласт и из какого объекта?
28. Что установил Э. Коккинг?
29. Расскажите о механическом и ферментативном методах выделения изолированных протопластов и сравните особенности этих методов.
30. Какие условия необходимы для культивирования изолированных протопластов?
31. Что такое морфогенез в условиях *in vitro*?
32. Расскажите о вторичной дифференцировке каллусной клетки.
33. Что такое клетки-инициали?
34. Объясните роль гистогенеза в клеточных культурах растений.
35. Какие типы морфогенеза характерны для культур *in vitro*? Расскажите о них.
36. Какие условия необходимы для перехода клеток к морфогенезу?
37. Перечислите стадии формирования соматических эмбриоидов из каллусной клетки.
38. Дайте определение термина «клональное микроразмножение».
39. Какие преимущества характерны для метода клонального микроразмножения, по сравнению с традиционными методами размножения растений?
40. Кто и когда впервые начал работы по клональному размножению растений? на каком объекте?
41. Охарактеризуйте основные этапы клонального микроразмножения растений.

42. Какие возможности дает метод термотерапии и на чем он основан?
43. Что такое хемотерапия и для чего она используется?
44. Расскажите о методах *in vitro*, которые используются для селекции растений.
45. Что такое эмбриокультура и для чего она используется?
46. Назовите способы получения гаплоидов в условиях *in vitro*.
47. Какие приемы необходимо использовать при проведении клеточной селекции?
48. Какие условия необходимы для получения стабильно устойчивых линий клеточных культур?
49. В чем преимущества клеточной селекции в условиях *in vitro*, по сравнению с обычными методами селекции?

Глава 4

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Генетическая инженерия — одно из наиболее быстро развивающихся направлений биотехнологии, зародившееся на стыке молекулярной биологии, генетики и биохимии и позволяющее осуществлять всевозможные манипуляции с генами различных организмов.

Впервые о нуклеиновых кислотах сообщил Ф. Мишер в 1869 г. Через 75 лет, в 1944 г., О.Т. Эвери с сотрудниками доказали, что именно молекула ДНК служит хранилищем наследственной информации. Они провели трансформацию неvirulentного штамма пневмококка в virulentный с помощью очищенного препарата дезоксирибонуклеиновой кислоты, выделенной из virulentных клеток. В 1953 г. Д. Уотсон и Ф. Крик создали модель структуры ДНК, а в 1966 г. М. Ниренберг, С. Очоа и Х.-Г. Корана расшифровали генетический код и выделили ферменты (лигазы и рестриктазы), участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот.

Датой основания генетической инженерии считается 1973 год, поскольку в 1972–1973 гг. П. Берг, Г. Бойер и С. Коэн с сотрудниками создали первую рекомбинантную ДНК, содержащую фрагменты ДНК вируса SV40, бактериофага λ и лактозного оперона *E. coli*. Через 10 лет после этого были получены трансгенные растения, позднее — трансгенные мыши, а через 20 лет — трансгенные овцы.

4.1. Молекулярные основы генетической инженерии

Генетическая инженерия представляет собой конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), или, иначе, — создание искусственных генетических программ (академик А.А. Баев). По Э.С. Пирузян, генетическая инженерия — это система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать

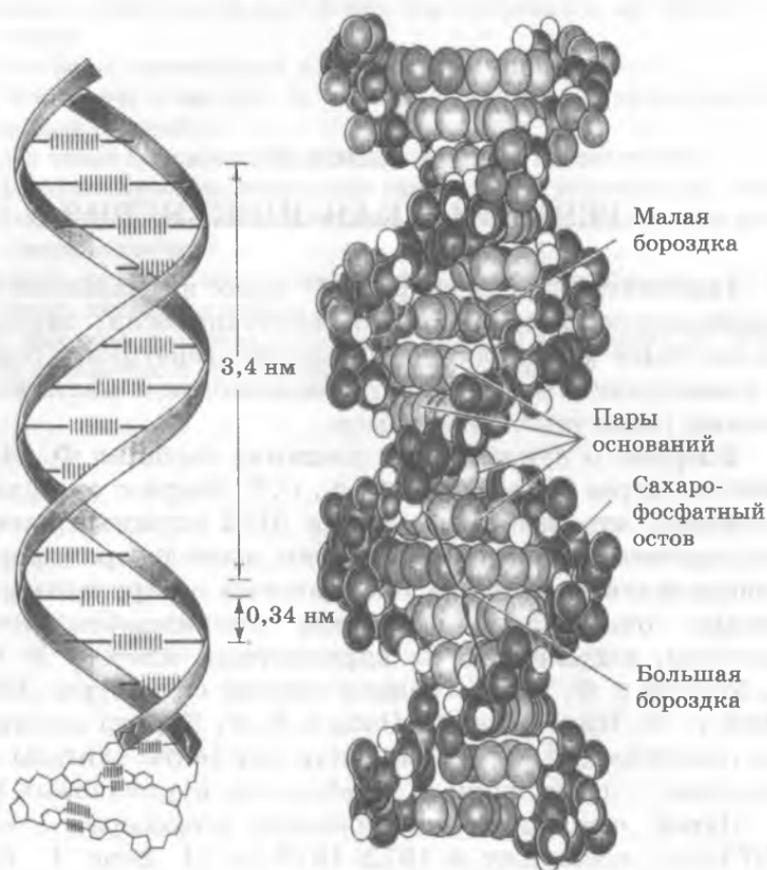


Рис. 4.1. Двойная спираль ДНК

лабораторным путем (в пробирке) искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных, или гибридных, молекул ДНК. Следовательно, основным объектом генетической инженерии является молекула ДНК, в которой закодирована вся информация о строении и функционировании любой живой клетки.

ДНК — это полимерная двухцепочечная молекула, построенная по принципу комплементарности (рис. 4.1). Комплементарность обеспечивает, во-первых, стабильность молекулы, во-вторых, — точное воспроизведение при построении дочерних цепочек. Мономером ДНК служат четыре типа нуклеоти-

дов, каждый из которых состоит из сахара — дезоксирибозы, фосфатной группы и азотистого основания. Нуклеотиды различают по азотистым основаниям, которые подразделяют на две группы: пуриновые (аденин и гуанин) и пиримидиновые (цитозин и тимин); в молекулах другой нуклеиновой кислоты — РНК — вместо тимина встречается урацил (рис. 4.2). Между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями возникают комплементарные взаимодействия (А — Т и Г — Ц), которые удерживают цепочки, состоящие из дезоксирибозы и фосфатной группы, относительно друг друга.

Размер молекулы ДНК измеряется числом пар комплементарных нуклеотидов — от нескольких тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.) до миллионов пар нуклеотидов (м. п. н.). У человека длина ДНК, составляющей первую хромосому, составляет 263 м. п. н.

Молекулы ДНК представляют собой генетическую информацию, важной единицей которой являются гены — элементарные носители, кодирующие информацию о синтезе одного определенного продукта. Поэтому каждый ген характеризуется строго определенной последовательностью нуклеотидов. Большая часть генов содержит информацию о строении белков, а некоторые кодируют только определенные молекулы РНК (например, рибосомальную РНК).



Рис. 4.2. Пуриновые (а) и пиримидиновые (б) азотистые основания (по В.П. Комову и В.Н. Шведовой, 2004)

Как уже отмечалось, в основе генетической инженерии лежит *целенаправленное* конструирование искусственных генетических систем вне организма и их введение в живой организм с целью создания нового организма (или модификации существующего). Это предполагает, что часть генов можно с помощью специальных ферментов вырезать из молекулы ДНК одного организма (донорная ДНК) и перенести в другой, реципиентный, организм. Такой перенос генов называется **трансгенозом**, а организмы, в ДНК которых включены чужеродные гены, носят название **трансгенных**.

Используемые для переноса генетические конструкции носят название **рекомбинантных ДНК**. В их состав входят фрагмент донорной ДНК (клонлируемая ДНК) и векторная ДНК (вектор, который отвечает за перенесение и встраивание — интеграцию — клонируемой ДНК). Молекулы рекомбинантной ДНК создают для клонирования необходимых участков ДНК, картирования ДНК, создания трансгенных организмов, массового получения продуктов, закодированных данным участком ДНК. Рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и обеспечивают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства.

Технология получения рекомбинантных ДНК включает следующие методические подходы:

1. Специфическое расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами.

2. Быстрое секвенирование всех нуклеотидов в определенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и кодируемую им аминокислотную последовательность.

3. Конструирование рекомбинантной ДНК.

4. Гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять с большой точностью и чувствительностью специфические последовательности РНК или ДНК, основанные на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот.

5. Клонирование ДНК путем введения ее фрагмента в бактериальную клетку, которая после такой трансформа-

ции воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий, или амплификация *in vitro*; создание геномных библиотек.

6. Введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.

Остановимся на этих технологиях более подробно.

Ферменты

Большинство ферментов выделяют из клеток бактерий и используют для «разрезания» или «сшивания» ДНК как прокариотических, так и эукариотических клеток.

Применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК ферменты можно подразделить на несколько групп:

— ферменты, с помощью которых выделяют фрагменты ДНК (*рестриктазы*);

— ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (*ДНК-полимеразы*) или РНК (*обратные транскриптазы, ревертазы*);

— ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (*лигазы*);

— ферменты, изменяющие строение концов фрагментов ДНК.

Рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции) — ферменты, с помощью которых выделяют фрагменты ДНК. Эти высокоспецифичные ферменты узнают и расщепляют определенные последовательности азотистых оснований в молекуле ДНК (сайты рестрикции). В генетической инженерии рестриктазы предназначены для вырезания необходимых участков из молекул донорной ДНК.

Рестриктазы выделяют из бактерий, но они также выявлены у дрожжей и одноклеточных водорослей. Номенклатура рестриктаз была предложена в 1973 г. С. Смитом и Д. Натансом. В соответствии с ней названия ферментам дают по тем бактериям, из которых они были выделены. Первая буква названия обозначает род микроорганизма, две следующие — его вид; далее идет порядковый номер данной рестриктазы в ряду других эндонуклеаз, выделенных из данного организма. Например: рестриктазы *Hpa I*, *Hpa II* — ферменты, выделенные из *Haemophilus parainfluenzae*; *Eco RI* — рестриктаза, выделенная из *E. coli*. Иногда вставляют еще одну, четвертую, латинскую букву — как указатель штам-

ма бактерий: *Hind* III — из *Haemophilus influenzae*. Если защитная система бактериальной клетки (система рестрикции — модификации) локализована в плазмиде, то указывают символ плазмиды — R, например: *Eco* RI.

Естественной функцией рестриктаз является защита бактерии от чужеродной ДНК (прежде всего от ДНК бактериофагов, которая может проникнуть в клетку и вызвать ее трансформацию). Они ограничивают возможность размножения фаговой ДНК, разрезая ее на части. Фермент рестрикции не может разрезать свою собственную ДНК, так как бактериальная ДНК модифицирована метилированием, осуществляемым ферментом ДНК-метилязой.

Определенные рестриктазы узнают в ДНК последовательности из нескольких (от четырех до восьми) нуклеотидов, осуществляя либо несимметричные, либо симметричные разрывы. При расщеплении молекула ДНК разрезается с образованием так называемых «липких» или «тупых» концов (рис. 4.3). «Липкие» концы образуются, когда разрывы в разных цепочках ДНК происходят со смещением друг относительно друга (рестриктазы *Eco* RI; *Hind* III), а «тупые» — когда разрывы в цепочках возникают друг против друга (рестриктазы *Taq* I; *Hpa* I; *Sma* I). В настоящее время выделено свыше 2000 рестриктаз, которые могут узнавать более 150 сайтов рестрикции.

Обратные транскриптазы, ДНК-полимеразы — ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК. В генетиче-



Рис. 4.3. Образование в ДНК «тупых» (а) и «липких» (б) концов под действием рестриктаз (по А.С. Коницеву и Г.А. Севастьяновой, 2003)

ной инженерии часто используется ДНК-полимераза I, выделенная А. Корнбергом и сотрудниками в 1958 г. из клеток *E. coli*. Этот фермент имеет трехдоменную структуру. При удалении N-концевого домена оставшаяся часть молекулы (фрагмент Кленова) сохраняет характерные для нее каталитические свойства. ДНК-полимераза в естественных условиях в клетке играет важную роль в репарации (восстановлении структуры) поврежденной ДНК, осуществляя так называемую ник-трансляцию (ник — разрыв в одной из цепей ДНК).

РНК-зависимая ДНК-полимераза, ревертаза — это ферменты, которые используют для синтеза комплементарной цепи ДНК с мРНК. Впервые их выделили Г. Темин и С. Мицутани в 1970 г. из вируса саркомы Рауса. Полученную двухцепочечную *комплементарную молекулу ДНК (кДНК)* можно затем встраивать в векторы, размножать в составе гибридных молекул ДНК и использовать для дальнейших исследований. Таким способом можно создавать кДНК-библиотеки. Следует отметить, что молекулы кДНК не содержат интронов, что позволяет клонировать ДНК эукариот в прокариотических системах.

Лигазы — ферменты, которые «сшивают» фрагменты ДНК за счет фосфодиэфирных связей, образующихся между 3'-гидроксильной концевой группой одного фрагмента ДНК и 5'-фосфатной группой другого фрагмента.

Из двух типов существующих лигаз для лигирования фрагментов ДНК обычно используют более универсальную лигазу фага T4, которая может «сшивать» как «липкие», так и «тупые» концы. ДНК-лигазы необходимы в естественных условиях в процессах репарации ДНК и репликации — при удвоении цепи ДНК.

Ферменты, изменяющие строение концов фрагментов ДНК. Например, щелочная фосфатаза отщепляет от линейного фрагмента молекулы ДНК 5'-фосфатные группировки, что значительно снижает количество образующихся случайных, нежелательных комбинаций фрагментов ДНК (в том числе тех, которые могут образоваться под действием ДНК-лигазы). Нуклеаза *Bal 31* — это фермент, неспецифически удаляющий нуклеотиды из последовательности ДНК. Он позволяет «подтупить» несимметричные концы ДНК либо укоротить фрагменты ДНК, сближая их функционально значимые элементы.

Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК

Секвенирование позволяет довольно быстро определить полную нуклеотидную последовательность ДНК длиной 100–500 нуклеотидных пар. Это необходимо для выяснения структуры, функций, возможностей рекомбинации и амплификации молекул или фрагментов молекул нуклеиновых кислот.

С помощью ферментов ДНК разделяют на фрагменты и определяют в них позиции нуклеотидов химическим или энзиматическим методом.

Химический метод был предложен в 1976 г. А. Максом и У. Гилбертом (рис. 4.4). Он основан на химической дег-

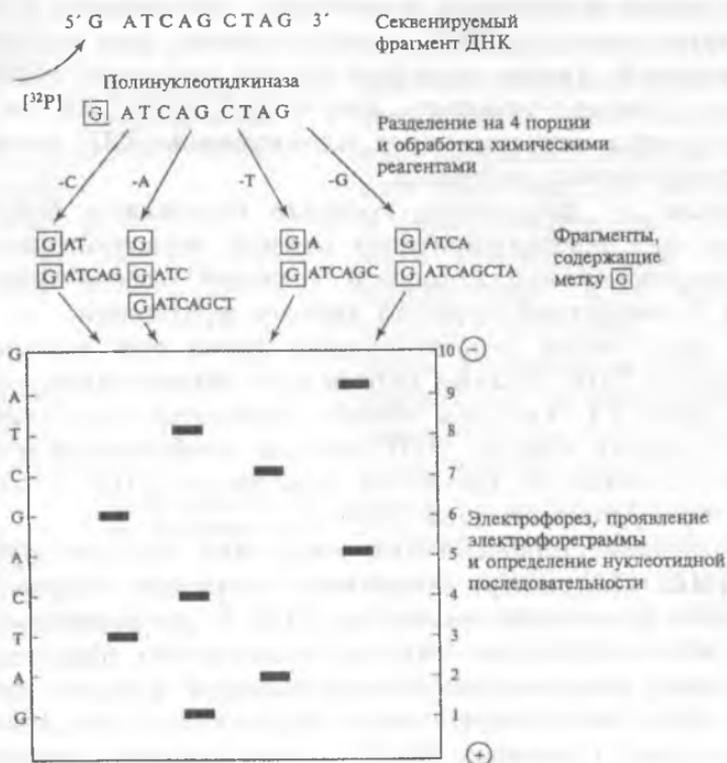


Рис. 4.4. Схема химического метода определения нуклеотидных последовательностей (по А.С. Коничеву и Г.А. Севастьяновой, 2003): 1–10 длина (число нуклеотидов) фракционируемых методом электрофореза радиоактивно меченных фрагментов

радации ДНК — специфической химической модификации пуриновых и пиримидиновых оснований с последующими выщеплением модифицированных нуклеотидов из цепи ДНК и анализом образовавшихся продуктов методом гель-электрофореза. Перед началом опыта один из концов фрагмента ДНК метят с помощью изотопа фосфора ^{32}P . Полученные электрофореграммы проявляют с помощью рентгеновской пленки. Таким образом, фракционируя на одной гелевой пластине фрагменты, образовавшиеся после специфического выщепления каждого из четырех нуклеотидов (А, Т, Г и Ц), можно непосредственно читать нуклеотидную последовательность секвенируемой ДНК по проявленной электрофореграмме.

Энзиматический метод, разработанный М. Сэнгером, основан не на химическом, а на ферментативном подходе. Сэнгер использовал ДНК-полимеразу I (рис. 4.5). Анализируемый фрагмент ДНК используют в качестве матрицы в реакции полимеразного копирования (синтеза комплементарной цепи ДНК) с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli*. Метод получил название «плюс-минус-метод», поскольку реакцию полимеризации в нем изначально проводили либо в отсутствие одного из четырех типов нуклеотидов («минус»-система), либо в присутствии только одного нуклеотида («плюс»-система), что ограничивает возможность наращивания полинуклеотидной цепи, т. е. останавливает (терминирует) ее синтез из-за недостатка соответствующего нуклеотида. Затем для остановки синтеза стали использовать специальные молекулы — терминаторы. Продукты реакций анализируют методом электрофореза, и секвенируемую последовательность считывают с радиоавтографа, так же как при анализе химического секвенирования.

В настоящее время определение точной нуклеотидной последовательности любого фрагмента ДНК вполне разрешимая задача. Уже определены последовательности не только сотен генов про- и эукариот, но и геномы многих организмов (более 800). Зная последовательность гена и генетический код, легко определить аминокислотную последовательность кодируемого им белка.

Конструирование фрагментов рекомбинантных ДНК («сшивка»)

Фрагменты рекомбинантных ДНК, полученные после действия рестриктаз и содержащие определенные гены, «сшивают» одним из трех основных методов, в зависимости от того, какие концы имеют фрагменты «сшиваемых» ДНК — «тупые» или «липкие».

«Сшивка» по одноименным «липким» концам. Это наиболее простой и популярный метод (рис. 4.6). Впервые этим методом гибридная ДНК была получена С. Коэном с сотрудниками в 1973 г. Любые два фрагмента ДНК (независимо от их происхождения), образовавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, дающей фрагменты рестрикции с «липкими» концами, могут «слипаться» за счет образования водородных связей между однонитиевыми участками комплементарных нуклеотидов. Однако после такого спаривания полная целостность двойной спирали не восстановится, поскольку останется два разрыва в фосфодиэфирном остове. Для его восстановления, т. е. «сшивания», или лигирования, нитей, используют ДНК-лигазу бактериофага Т4. Этот фермент в живой клетке выполняет ту же функцию: «сшивание» фрагментов ДНК, синтезирующихся при репликации.

«Сшивка» по «тупым» концам. «Тупые» концы можно соединять за счет действия ДНК-лигазы. В этом случае реакция лигирования имеет свои особенности и ее эффектив-

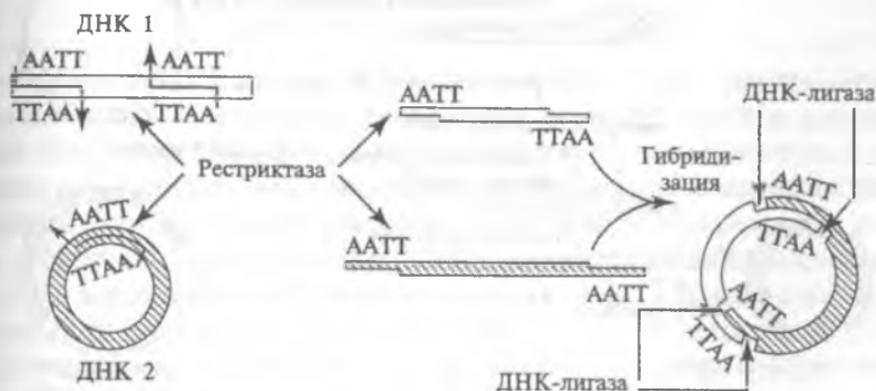


Рис. 4.6. Схема метода получения гибридных молекул ДНК за счет «сшивки» фрагментов по одноименным «липким» концам (по А.С. Конищеву и Г.А. Севастьяновой, 2003)

ность ниже, чем при «сшивке» по «липким» концам. Впервые такие эксперименты были выполнены в 1972 г. П. Бергом в Стэнфордском университете (США). В частности, этот метод используют при клонировании ДНК-копий матричных РНК, которые доступны в ограниченных количествах.

«Сшивка» фрагментов с разноименными концами. В ситуации, когда необходимо «сшить» фрагменты, образованные разными эндонуклеазами рестрикции и имеющие разные, т. е. некомплементарные друг другу, «липкие» концы, применяют так называемые линкеры (или «переходники»). Линкеры — это химически синтезированные олигонуклеотиды, представляющие собой сайты рестрикции или их комбинацию. Впервые эту идею предложил Г. Шеллер с сотрудниками в 1977 г. Существуют большие наборы таких генных «переходников». «Липкие» концы также можно ферментативным путем присоединить к молекулам ДНК с «тупыми» концами. При этом первоначально «достраивают» недостающие фрагменты, чтобы образовались комплементарные «липкие» концы. Далее для ковалентного соединения двух фрагментов используют ДНК-лигазу. Поскольку можно формировать достаточно длинные взаимно-комплементарные одноцепочечные концы, гибридные молекулы образуются с высокой эффективностью (рис. 4.7).

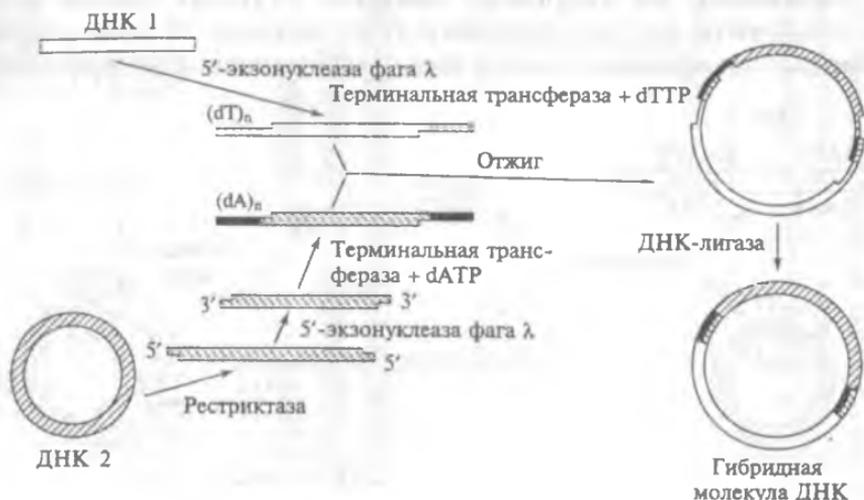


Рис. 4.7. Схема метода получения гибридных молекул ДНК за счет «сшивки» фрагментов по разноименным концам (по А.С. Коничеву и Г.А. Севастьяновой, 2003)

Гибридизация — метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов

Реакция гибридизации используется в генетической инженерии для анализа гибридных молекул ДНК как весьма чувствительный метод выявления определенных последовательностей в ДНК и РНК.

Гибридизация основана на способности азотистых оснований образовывать комплементарные пары. Если солевой раствор ДНК нагреть до 100 °С и повысить рН до 13, то ДНК диссоциирует на две отдельные цепи (*денатурирует, плавится*), так как комплементарные связи между основаниями разрушаются. Этот процесс (его называют ренатурацией или гибридизацией, отжигом) обратим: выдерживание ДНК при температуре 65 °С приводит к восстановлению структуры двойной спирали. Процессы гибридизации происходят между любыми одинарными цепями, если они комплементарны: ДНК — ДНК, РНК — РНК, РНК — ДНК.

Для теста необходимо иметь одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный той последовательности, которую хотим обнаружить. Этот фрагмент получают либо клонированием, либо путем химического синтеза. Одноцепочечная ДНК, используемая в качестве индикатора, называется ДНК-зондом. Она может содержать от 15 до 1000 нуклеотидов.

Методы клонирования ДНК

Методами клонирования фрагменты ДНК любого вида, полученные с помощью рестриктаз, можно ввести в плазмиду или в бактериофаг, получив таким образом вектор, а затем размножить эти генетические элементы в клетках бактерий или дрожжей, увеличивая их число в миллионы раз.

Методы клонирования ДНК основаны на двух подходах: — использование бактериальных или дрожжевых клеток для размножения введенной в них чужеродной ДНК (клонирование ДНК *in vivo*), а также создание банка генов (геномной библиотеки);

— амплификация ДНК *in vitro*.

Для биотехнологических экспериментов часто необходимо идентифицировать гены, кодирующие определенные

структурные белки. Искомые последовательности можно обнаружить и идентифицировать благодаря геномным библиотекам, используя три широко распространенных метода: гибридизацию с меченым ДНК-зондом (ДНК-гибридизация) с последующим радиоавтографическим анализом, иммунологический скрининг, скрининг по активности белка, кодируемого искомым геном.

ДНК-гибридизация состоит в комплементарном спаривании ДНК-мишени и меченого ДНК-зонда. Гибридные молекулы наиболее часто определяют радиоавтографическим методом.

Два других метода предполагают обнаружение ДНК-мишени благодаря продукту ее экспрессии — белку или его части. Присутствие белка обнаруживают иммунологическими методами (*иммунологический скрининг*) либо по активности белкового продукта, если таковая имеется (*скрининг по активности белка*).

Получение нужного гена, намеченного для переноса, возможно либо путем выделения его из подходящего генома, либо методами синтеза химическим или ферментативным путем, либо с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Часто нужный ген выделяют из банка генов.

Клонирование ДНК *in vivo*

Чтобы клонировать ДНК *in vivo*, создают банк генов (библиотеку ДНК), т. е. коллекцию клонов ДНК, включающих все фрагменты генома данного вида. Используя микроорганизмы, можно создавать два типа библиотек ДНК: геномную и клоновую (кДНК).

Геномная библиотека. Первую геномную библиотеку создал Т. Маниатис с сотрудниками в 1978 г. Они использовали ДНК из генома *D. melanogaster*, которую клонировали в клетках *E. coli*. Для создания банка генов выделяют всю геномную ДНК, разрезают ее с помощью рестриктаз или методом «дробовика» (ультразвуком) на отдельные фрагменты, присоединяют к плазмидным или вирусным векторам и вводят в реципиентные бактерии для их последующего клонирования.

Многие плазмиды-вектора несут ген устойчивости к антибиотикам, и если в рекомбинантной плазмиде есть такой ген, то трансформированные клетки (колонии) легко выявить, выращивая их на среде с антибиотиком. Каждая такая колония представляет собой клон, или потомство, одной клетки. Плазмиды одной колонии содержат клон геномной ДНК, а совокупность плазмид, несущих разные участки генома, можно назвать библиотекой геномной ДНК. В таком виде банк можно сохранить.

Недостаток геномных библиотек в том, что фрагменты ДНК образуются в огромном количестве. Разрезание геномной ДНК определяется случаем, поэтому лишь часть фрагментов содержит полноразмерные гены. Некоторые фрагменты могут содержать только часть гена или же интронные последовательности.

Библиотека генов может храниться и использоваться неограниченно долго. В ней содержится вся наследственная информация организма. Банк генов — это не только источник для получения нужного трансгена, но и источник материала для изучения структуры, функции и регуляции индивидуальных генов, структуры и функций белков. С его помощью можно также решить проблему сохранения генофонда исчезающих видов.

Клоновая библиотека генов (кДНК). Помимо геномных, существуют библиотеки кДНК — молекул ДНК, которые являются комплементарными копиями зрелых мРНК, прошедших процессинг; они не содержат интронов. Создание кДНК начинается с синтеза на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы комплементарной нити ДНК. Затем создают щелочные условия, разрушают цепь РНК на нуклеотиды, после чего с помощью ДНК-полимеразы синтезируют комплементарную цепь ДНК. При этом образуется фрагмент ДНК с «тупыми» концами. Такую ДНК встраивают в плазмиды и вводят в клетки бактерий. При амплификации плазмиды образуется клон комплементарной копии ДНК (кДНК).

Существенные преимущества библиотеки кДНК заключаются в том, что она представляет собой библиотеку транскрибируемых генов, которая ничем не прерывается,

тогда как в геномной библиотеке не обязательно присутствуют только дискретные гены (рестриктазы могут разрезать ДНК и внутри гена).

Кроме того, гены эукариот содержат интроны, которые должны удаляться из транскриптной РНК перед превращением ее в матричную. Этот процесс называется **сплайсингом** (созревание — удаление последовательностей, не кодирующих белковые продукты). После чего следует сращивание. Бактериальные клетки не могут осуществлять такую модификацию РНК, образовавшуюся путем транскрипции гена эукариотической клетки. Поэтому если преследуется цель получения белка путем экспрессии клонированного гена, то лучше использовать банк кДНК, полученной на основе матричной РНК. Библиотека кДНК отражает спектр генетической активности в клетках, из которых она была выделена. Создание таких библиотек полезно для сравнения генетической активности в клетках разных тканей.

Поиск нужных генов в геномной библиотеке. Одним из методов поиска нужных генов в банке является гибридизация, включающая блоттинг (от англ. blotting — промокание). **Блоттинг** — это метод перенесения фрагментов нуклеиновых кислот на специальную пленку (мембрану) из нитроцеллюлозы, связывающую (иммобилизующую) эти молекулы.

Саузерн-блоттинг (назван по фамилии предложившего его автора) основан на перемещении фрагментов ДНК благодаря капиллярному эффекту. Процесс переноса фрагментов ДНК, находящихся в агарозном геле, на пленку из нитроцеллюлозы с помощью фильтровальной бумаги похож на промокание.

Анализ проводят в такой последовательности:

— выделенную ДНК разделяют в агарозном геле, где происходит электрофоретическое разделение ее фрагментов по массе и заряду;

— после разделения фрагментов ДНК в агарозном геле его обрабатывают растворами, денатурирующими ДНК (происходит образование одноцепочечных ДНК). Далее гель помещают на фильтровальную бумагу, смоченную концентрированным солевым (буферным) раствором;

— на гель накладывают нитроцеллюлозный фильтр, на который происходит иммобилизация (или адсорбция, или фиксация) одноцепочечных фрагментов ДНК;

— поверх фильтра накладывают стопку листов сухой фильтровальной бумаги, которая обеспечивает медленный ток буферного раствора через гель (т. е. служит своеобразным капиллярным насосом). Солевой раствор, проходя через агарозный гель, увлекает за собой фрагменты ДНК, которые задерживаются нитроцеллюлозой и связываются с ней, а раствор впитывается сухой фильтровальной бумагой;

— фильтр выдерживают в вакууме при температуре 80 °С, в результате чего одноцепочечные фрагменты ДНК необратимо иммобилизуются (фиксируются) на нитроцеллюлозе. При этом расположение полос иммобилизованной ДНК точно соответствует их расположению в геле;

— ДНК, связанную с фильтром, помещают в раствор с меченым ДНК-зондом, в котором происходит гибридизация. Гибридизироваться (образовывать водородные связи) со специфическим зондом будут только комплементарные ему фрагменты ДНК, которые можно обнаружить в виде темных полос на рентгеновской пленке, т. е. на радиоавтографии нитроцеллюлозного фильтра.

Для анализа РНК применяют *Нозерн-блот-гибридизацию*, во многом похожую на *Саузерн-блоттинг*. В данном случае молекулы РНК, выделенные из клетки, разделяются по размерам с помощью гель-электрофореза, а затем переносятся на фильтр. После гибридизации с меченым одноцепочечным зондом выявляются места гибридизации (гомологии) РНК и зонда. В этом методе в качестве зонда обычно используют фрагменты ДНК.

Амплификация ДНК *in vitro*

Амплификация — это увеличение числа копий молекул ДНК. В отличие от клонирования ДНК *in vivo*, которое происходит в клетках прокариот, дрожжей, других эукариотических организмов, амплификация осуществляется вне клетки (*in vitro*) с помощью химических методов: *полимеразной цепной реакции (ПЦР)*, *лигазной цепной реакции*, *NASBA-метода* (Nucleic Acid Sequence — Base Amplification).

В 1985 г. К. Мюллис с сотрудниками разработал метод клонирования последовательностей ДНК *in vitro*, который получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР) (рис. 4.8). Амплификация фрагментов ДНК осуществляется благодаря работе особого фермента Таq-полимеразы (термостабильная ДНК-полимераза из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*) в присутствии четырех типов нуклеоти-

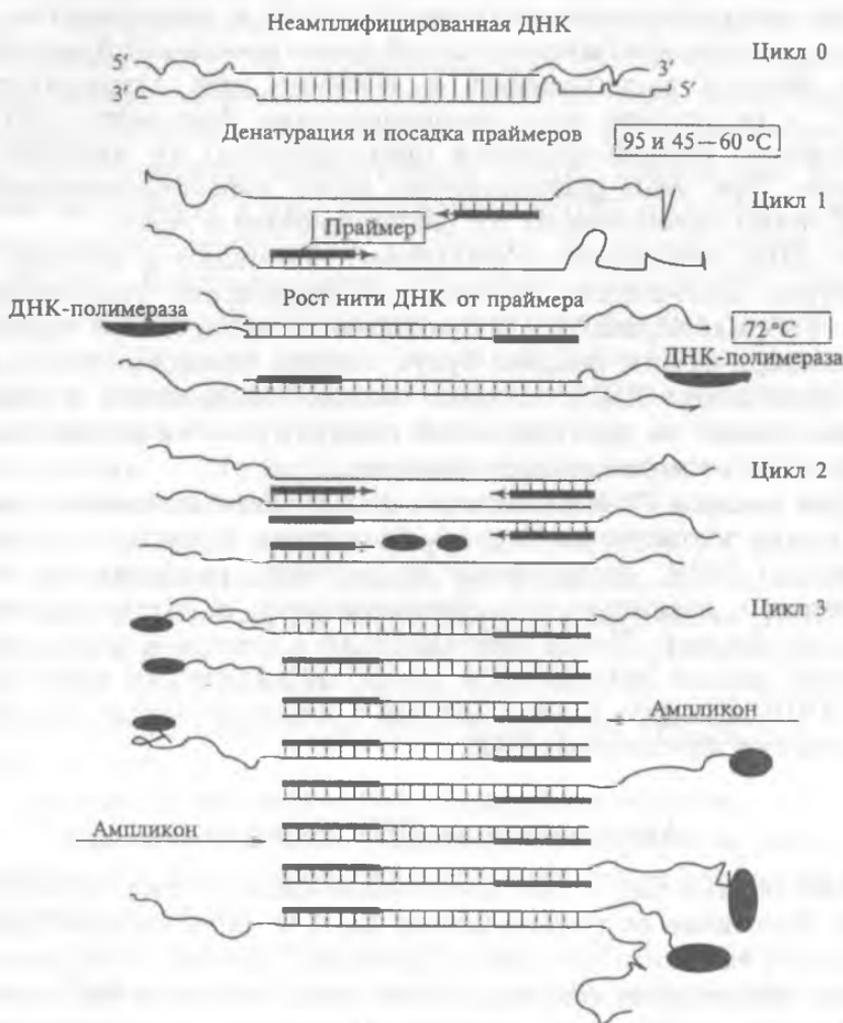


Рис. 4.8. Схема полимеразной цепной реакции (ПЦР)
(по А.С. Конищеву и Г.А. Севастьяновой, 2003)

дов и праймеров (коротких цепочек ДНК размером около 20 нуклеотидов, которые выступают в качестве затравок). Процесс циклический, проходит в несколько этапов: термическая денатурация (разделение комплементарных цепей ДНК при температуре 93–95 °С), охлаждение до 60 °С, связывание праймеров с одноцепочечными ДНК, синтез второй нити ДНК с помощью Таq-полимеразы. Повторяя циклы амплификации, можно получать миллионы копий фрагментов ДНК. Таким образом, в процессе рассматриваемой реакции эффективно амплифицируется только та последовательность ДНК, которая ограничена праймерами.

Размноженный *in vitro* фрагмент получают в количествах, достаточных для его прямого секвенирования. Поскольку при этом не требуется промежуточный этап клонирования фрагмента ДНК в молекулярных векторах, ПЦР иногда называют *бесклеточным молекулярным клонированием* (cell-free molecular cloning). Автоматизированная процедура Таq-полимеразной цепной реакции, состоящая из 30 и более циклов, занимает 3–4 ч, что существенно быстрее и проще процедуры клонирования определенного фрагмента ДНК в составе векторных молекул.

Для *лигазной цепной реакции* используют другой фермент — термостабильную ДНК-лигазу.

Наиболее универсальным методом амплификации служит *NASBA-метод*. В отличие от ПЦР, он осуществляется при температуре 41 °С, т. е. является изотермальным. Кроме того, в этом методе используют другие ферменты: РНК-полимеразу фага Т7, РНКазу Н и обратную транскриптазу вируса птичьего миелобластоза. Метод крайне чувствительный, его можно использовать для контроля пищевых продуктов, в медицинской диагностике, в судебно-медицинской практике.

Введение нового (рекомбинантного) гена в клетку

Введение нового гена в клетку можно провести двумя способами: *используя вектор* или *путем прямого введения*.

Вектор — молекула ДНК или РНК, способная переносить включенные в нее чужеродные гены в клетку, где эти

молекулы реплицируются автономно или после интеграции с геномом (хромосомой). Не каждая молекула ДНК или РНК может быть вектором.

Векторы должны обладать *определенными свойствами*, в числе которых:

1) способность к автономной (т. е. независимо от хромосомы реципиента) репликации в клетке реципиента. Например, для репликации в клетке бактерии вектор должен содержать сайт *ori* (участок инициации репликации);

2) наличие области, в которую возможно встраивание необходимого фрагмента ДНК. Для этого вектор должен содержать один или более участков (сайтов рестрикции), чувствительных к определенным рестриктазам, которые расщепляют вектор и позволяют встроить желаемую последовательность нуклеотидов (трансген);

3) небольшой размер, так как при длине более 15 т. п. н. значительно снижается эффективность клонирования чужеродной ДНК;

4) наличие *маркерных генов*, позволяющих отличить трансформированные клетки от исходных. Это могут быть *селективные* (придающие клеткам устойчивость к антибиотикам, гербицидам) или *репортерные* (клетки удобно тестировать по изменению окраски продуктов этих генов) гены;

5) наличие соответствующего промотора, под который необходимо поместить чужеродный ген для экспрессии в клетке бактерии.

Последовательности ДНК, расположенные перед началом структурного гена и определяющие степень активности РНК-полимеразы, называются **регуляторными последовательностями**. Одна из таких последовательностей представляет собой участок ДНК, с которым связывается РНК-полимераза. Этот участок называется **промотором**.

Регуляторные последовательности эукариотических генов отличаются от прокариотических, и бактериальная РНК-полимераза не узнаёт их. Поэтому для экспрессии эукариотических генов в клетках прокариот нужно, чтобы гены находились под контролем бактериального промотора (т. е. промотора клетки-хозяина). В качестве промотора широко

используют промотор гена, локализованного в коммерческих векторах, например pBR322, lac-промотор *E. coli* и др.

Таким образом создается вектор, т. е. создается целая генетическая конструкция, в состав которой, помимо трансгена, вводятся маркерные гены и соответствующие регуляторные последовательности.

Типы векторов. В качестве векторных молекул могут служить *плазмиды бактерий* или *дрожжей* (простых эукариотических организмов), *ДНК бактериофагов* или *вирусов*, *искусственные хромосомы дрожжей (YAC)* и *бактерий (BAK)*. Созданы также гибридные (искусственные) векторы — *фазмиды*, объединяющие преимущества плазмид и фагов. Для клонирования небольших фрагментов ДНК используют плазмиды, фаговые ДНК, а для крупных — космиды и искусственные хромосомы.

1. *Плазмиды.* Основой для создания вектора обычно служат бактериальные плазмиды. Это небольшие внехромосомные, автономно реплицирующиеся кольцевые молекулы ДНК, которые в количестве нескольких копий содержатся в клетках бактерий. Природные плазмиды часто содержат гены, полезные для бактерий: придающие устойчивость к антибиотикам и ионам тяжелых металлов (R-плазмиды); контролирующие способность разрушать различные трудно-разлагаемые токсические соединения (нафталин, камфару, толуол, ксилол, различные пестициды и др.); плазмиды биодegradации, или D-плазмиды.

Некоторые плазмиды за счет специфического сайта инициации репликации могут реплицироваться в клетках только одного вида бактерий; это так называемые *плазмиды с узким спектром хозяев*. Другие плазмиды, с менее специфичным сайтом, могут реплицироваться в клетках разных видов бактерий; это *плазмиды с широким спектром хозяев*. Указанные особенности плазмид с успехом используют при создании векторов.

Однако есть свойства, которые не позволяют природным плазмидам выступать в качестве вектора. Так, их размер может достигать от 1 т. п. н. до 500 т. п. н., т. е. размер в большинстве случаев значительно превышает допустимый.

Кроме того, не все плазмиды несут в себе гены, которые могут служить маркерами для опознавания трансгенных клеток. Поэтому для эффективного трансгеноза приходится конструировать на основе плазмид с помощью методов генетической инженерии искусственные векторные системы (плазмидные векторы). В настоящее время предложен целый арсенал коммерческих векторов, созданных на основе бактериальных плазмид.

Например, плазмидный вектор pBR322 создан на основе плазмиды *E. coli* (рис. 4.9). Плаزمида pBR322 имеет сайт *ori* (область, ответственную за репликацию плазмиды), гены устойчивости к антибиотикам ампициллину и тетрациклину, причем в генах устойчивости к этим антибиотикам имеются сайты рестрикции. Если фрагмент чужеродной ДНК встраивается в один из генов устойчивости, то послед-

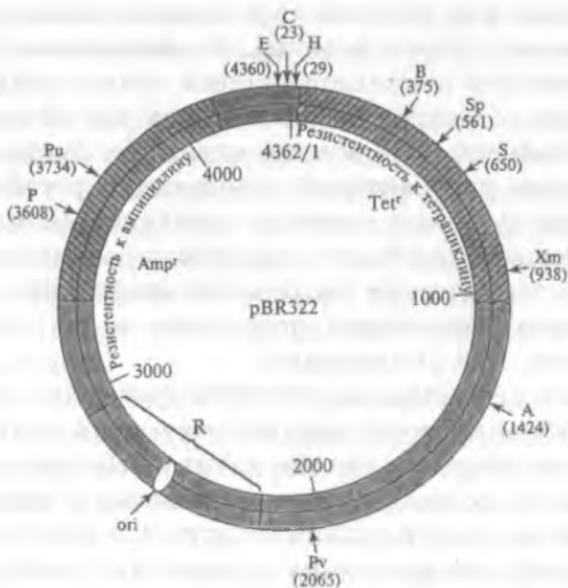


Рис. 4.9. Схема строения плазмидного вектора pBR322 (по А.С. Коничеву и Г.А. Севастьяновой, 2003): *ori* — точка начала репликации; *Amp^r* и *Tet^r* — гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину (указаны сайты рестрикции для различных рестриктаз, цифры обозначают число нуклеотидных пар); R — репликон

ний инактивируется. Следовательно, успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов легко детектировать по исчезновению у бактерий устойчивости к данному антибиотику, так как при этом сохраняется устойчивость к другому антибиотику. То есть вектор дает возможность детектировать только те клоны бактерий, которые содержат рекомбинантную плазмиду.

Строение векторов может быть разнообразным, но все они обязательно должны включать в себя несколько сайтов для встраивания фрагментов донорной ДНК и обеспечивать простую идентификацию трансформированных клеток. В плазмидах можно клонировать фрагменты ДНК размером не более 10 т. п. н.

2. Вирусы — самые маленькие и самые простые из всех патогенов. Они являются одними из главных кандидатов на роль векторов для введения чужеродной ДНК. Из них создают векторы на основе РНК, вириодеспецифичных ДНК, комбинации вириодеспецифичных ДНК с T_i -плазмидами. При вирусной инфекции каждая клетка может получить большое число копий чужеродного гена. ДНК можно встраивать так, чтобы она находилась под контролем сильного вирусного промотора, что обеспечит высокий уровень экспрессии гена, и его продукты будут более доступны для исследования. В генетической инженерии часто используют 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты. Этот промотор не обладает тканевой специфичностью и активен не только в клетках крестоцветных, но и в клетках растений других семейств. Вирус должен быть жизнеспособным после рекомбинирования его ДНК. Легче всего вирусы вводят в бактерии. Недостаток вирусов как векторов заключается в их небольшой емкости. Кроме того, они заражают небольшой круг хозяев.

3. Челночные векторы — это плазмидные векторы, предназначенные для работы в клетках разных организмов (животных и бактерий). Чаще всего для клонирования генов используют векторы с одним сайтом репликации для работы с *E. coli*. При необходимости использования других бактерий или эукариотических клеток в векторы встраивают второй сайт инициации репликации, обеспечи-

вающий их работу и в других клетках. Именно такие векторные системы называются **челночными**. Наиболее распространенные векторы состоят из плазмиды pBR322 и интактного раннего района транскрипции ДНК вируса SV40, а нужный ген встраивается под контроль промотора поздних генов или дополнительного раннего промотора. Челночные векторные системы экспрессии разработаны для дрожжей, насекомых и клеток млекопитающих. Челночные векторы, созданные на основе бакуловирусов для работы в клетках *E. coli* и насекомых, называются **бакмидами**.

4. Транспозоны — это сегменты ДНК, которые контролируют собственное перемещение из одного сайта ДНК в другой путем выхода из исходного сайта и внедрения в новый сайт хромосомы или плазмиды. Впервые транспозоны были открыты в 1940-х гг. американским ученым Барбарой Мак-Клинтон у кукурузы. Транспозоны как бы передвигаются по всему геному растения. В течение многих лет кукуруза оставалась единственной системой, в которой обнаруживались такие подвижные генетические элементы. Сейчас они выявлены у бактерий, дрозофил и других организмов.

Механизм перемещения фрагментов ДНК по геному до конца не выяснен. Поскольку подвижные гены могут перемещаться в пределах генома с одного места на другое, то они могут быть весьма эффективными векторами для передачи рекомбинантной ДНК. Генетическая трансформация с помощью векторов на основе транспозонов была впервые осуществлена на дрозофиле. С их помощью можно переносить довольно крупные участки ДНК. Этот метод переноса генов имеет значительные преимущества, так как он осуществляется с высокой частотой и не сопровождается значительными перестройками в интегрируемой ДНК.

5. Векторные системы, предназначенные для клонирования крупных фрагментов ДНК:

— *космиды* — векторные системы, которые объединяют в себе участки плазмидных ДНК (ген-маркер и репликон плазмиды) и ДНК бактериофага. Термин обозначает, что вектор является плазмидой, внутри которой вставлен участок фага λ (cos-site), представляющий собой нуклеотидную последовательность, отвечающую за упаковку фа-

говой ДНК в ее протеиновую капсулу. Космиды могут переносить до 40 т. п. н. клонируемой ДНК в клетки *E. coli*;

— *фазмиды* — векторы, которые также представляют собой искусственные гибриды между фагом и плазмидой. В зависимости от условий, после встраивания чужеродной ДНК они могут размножаться как фаги или как плазмиды;

— *бактериальная искусственная хромосома* (BAC — от англ. bacterial artificial chromosomes) — также способна переносить участки чужеродной ДНК от 150 до 300 т. п. н. Служит для трансформации животных клеток;

— *дрожжевая искусственная хромосома* (YAC — от англ. yeast artificial chromosomes) — сконструирована для переноса особо крупных участков чужеродной ДНК, вмещающих фрагменты геномной ДНК длиной от 100 т. п. н. до 1 м. п. н. Для их создания к плазмиде дрожжей «пришивают» центромерные последовательности, теломеры, последовательности для автономной репликации в дрожжевой клетке, сайты рестрикции и селективные маркеры.

В качестве возможных векторов для переноса генов предполагается использовать хлоропластные и митохондриальные ДНК.

Для идентификации трансформированных клеток, несущих рекомбинантную ДНК, вектор должен содержать один или несколько генов-маркеров. Выделяют две группы маркерных генов, позволяющих отличить трансформированные клетки от исходных, — это селективные и репортерные гены:

— *селективные гены* — придают клеткам селективное преимущество, т. е. устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.) или гербицидам (у растений). Основной принцип работы такого маркера — способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, т. е. нормальных, клеток. Трансформанты отбирают на средах с высоким содержанием этих веществ. Например, в присутствии гена лактомазы бактериальная клетка приобретает устойчивость к ампициллину и на среде с этим антибиотиком образует клон (несущий данный ген), тогда как обычные клетки (без данного гена) на этой среде погибают;

— *репортерные гены* — кодируют нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях легко обнаружить. В качестве репортерных чаще всего используют гены β -глюкуронидазы (*uidA*, другое название — *gus*), зеленого флюоресцентного белка (*gfp*), люциферазы (*luc*), хлорамфениколацетилтрансферазы (*cat*). Из них в большей степени применяют гены, кодирующие белки GUS и GFP, и в меньшей — кодирующие белки LUC и CAT.

Ген *uidA* (*gus*) является модифицированным геном из *E. coli*, кодирующим β -глюкуронидазу. Он может гидролизовать обширный спектр природных и синтетических глюкуронидов, что позволяет подбирать соответствующие субстраты для спектрофотометрического или флюориметрического определения активности фермента, а также для гистохимического окрашивания тканей *in situ* (в синий цвет). В составе химерных белков, созданных генно-инженерными методами, GUS обычно сохраняет свою функциональную активность.

GFP (green fluorescent protein — зеленый флюоресцентный белок) был обнаружен Т. Шимомурой и соавторами в 1962 г. у люминесцирующей медузы *Aequorea victoria*. Он обладает особым свойством — способен флюоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при облучении длинноволновым УФ. Для проявления флюоресценции не требуется субстратов или кофакторов. Ген *gfp* был клонирован в 1992 г. Г. Прашером и соавторами. Благодаря свойству белка, *gfp* является очень перспективным репортерным геном, позволяет проводить разнообразные прижизненные (недеструктивные) исследования с трансгенными организмами. Определяется гистохимически, по изменению окраски ткани при добавлении соответствующего субстрата.

Ген *luc* кодирует фермент люциферазу (клонирована из бактерий и светлячка). Люцифераза обеспечивает переход люциферинов из окисленной формы в основную, что вызывает свечение трансформированных клеток растений, накапливающих этот белок.

Ген *cat* отвечает за синтез хлорамфениколацетилтрансферазы (выделен из *E. coli*). Этот фермент катализирует реак-

цию переноса ацетильной группы от ацетил-КоА к хлорамфениколу. Определяется только радиоизотопными методами.

Область применения селективных генов в основном связана с простым контролем трансгеноза. Репортерные гены позволяют выявлять (по возможности количественно) временные и пространственные особенности экспрессии данного конкретного гена (собственного или чужеродного). Присоединение репортерного гена к одной лишь промоторной области позволяет исследовать в «чистом виде» ее роль в регуляции экспрессии изучаемого гена на уровне транскрипции.

Методы прямого переноса генов в клетку

В качестве реципиентов, в геном которых встраиваются чужеродные гены, используют клетки культуры, эмбриональные клетки млекопитающих, дрозофилы, пронуклеусы млекопитающих; у растений — протопласты, изолированные клетки и ткани, микроспоры, незрелые зиготические зародыши, проростки.

Для введения генетического материала в клетки разных организмов применяют ряд общих методов прямого переноса, таких, как трансформация, электропорация, микроинъекция и др.

Трансформация — метод введения рекомбинантной ДНК в клетку благодаря увеличению проницаемости ее клеточной оболочки (вероятно, за счет локального разрушения последней). Клетки обрабатывают ледяным раствором CaCl_2 , а затем выдерживают при температуре 42 °С в течение 1,5 мин.

Трансдукция — процесс переноса (передачи) бактериальной ДНК из одной клетки в другую бактериофагом. Общая трансдукция используется в генетике бактерий для картирования генома и конструирования штаммов.

Трансфекция — метод предполагает введение ДНК, адсорбированной на кристаллах фосфата кальция (кальциевый преципитат), в клетку путем фагоцитоза. Для трансфекции используют и ДЭАЭ-декстран — полимер, адсорбирующий ДНК. Эффект вхождения в клетки и время экспрессии высоки, но частота стабильной трансформации

ниже, чем при использовании преципитата кальция. Частоту трансфекции увеличивает глицериновый шок (4 мин в 15%-м растворе глицерина в NEPE8-буфере).

Электропорация — метод заключается в воздействии импульсов высокого напряжения электрического тока на клеточную мембрану, которое, скорее всего, вызывает временное образование большого количества пор, что обратимо увеличивает проницаемость мембран. Через образующиеся на короткое время поры чужеродная ДНК проникает в клетку. Это простой, эффективный и воспроизводимый метод. С его помощью были получены трансгенные растения кукурузы, риса и сахарного тростника.

Микроинъекции ДНК — метод позволяет с помощью тонких микроигл и микроманипулятора вводить в клетку или прямо в ядро векторную ДНК с включенным в нее трансгеном. С помощью микроинъекций осуществляется трансформация у дрозофилы и растений (ячмень, капуста). Метод, разработанный в начале 1970-х гг. А. Андерсоном и Г. Диакумаком, дает небольшой выход трансформированных клеток. Его преимуществом является возможность вводить любую ДНК в любые клетки; кроме того, для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

Упаковка в липосомы. Липосомы — сферические тельца, оболочки которых образованы фосфолипидами. Липосомы, содержащие внутри рекомбинантную ДНК, способны непосредственно сливаться с мембраной клетки или поглощаться клетками. В клетке происходит разрушение оболочки липосом и высвобождение ДНК. Это один из методов, позволяющих защитить трансформированный генетический материал от разрушения нуклеазами, присутствующими вне клеток. Метод применяется для введения нуклеиновых кислот в культивируемые животные клетки и растительные протопласты.

Биологическая баллистика — один из самых эффективных методов трансформации однодольных и хвойных растений (в которые не удается ввести чужеродную ДНК с помощью агробактерий), а также трансформации животных клеток. Метод базируется на напылении рекомбинант-

ной ДНК на мельчайшие частицы золота или вольфрама (диаметр частиц 0,6–1,2 мкм), которыми бомбардируют клетки. Бомбардировку осуществляют с помощью генной пушки за счет перепада давления или под действием электрического разряда. При достаточной скорости эти частицы могут непосредственно проникать в ядро, что сильно повышает эффективность трансформации. Часть клеток, которые находятся в чашке Петри в центре непосредственно под пушкой, гибнет, а часть, расположенная по периферии чашки, выживает и трансформируется. С помощью генной пушки были трансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения-трансформанты.

4.2. Основные этапы создания трансгенных организмов

Процесс создания трансгенного организма достаточно сложен и часто требует индивидуального подхода. Однако в любом случае его можно подразделить на несколько общих этапов:

1. Получение (выделение) нужного гена (трансгена), намеченного для переноса. Ген может быть выделен из естественных источников (из подходящего генома) или из геномной библиотеки; синтезирован искусственно — химическим (по имеющейся последовательности нуклеотидов) или ферментативным (с использованием механизма обратной транскрипции: синтез кДНК на матрице мРНК с помощью обратной транскриптазы) путем; получен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. Создание специальных генетических конструкций — векторов (переносчиков), в составе которых содержатся гены (трансгены), которые будут внедряться в геном другого вида или экспрессироваться в клетках про- или эукариот. Для конструирования *рекомбинантной ДНК (рекДНК)* векторную ДНК (например, плазмиду) и чужеродную ДНК, содержащую интересующий ген (трансген), разрезают одной и той же рестриктазой; в результате образуются одинаковые концы. К генам, синтезированным химическим путем или полученным по матрице их мРНК, такие концы

можно «пришить» искусственно. Затем производят смешивание фрагментов ДНК (вектора и трансгена) и «сшивание» их ДНК-лигазой. Концы чужеродной ДНК и плазмиды взаимодействуют друг с другом, образуя комплементарные пары оснований. Происходит гибридизация векторной и чужеродной ДНК. Концы фрагментов замыкаются с помощью водородных связей и ковалентно «сшиваются» с помощью фермента ДНК-лигазы.

3. Генетическая трансформация, т. е. перенос и включение рекДНК, содержащей трансген, в клетки реципиента (например, *E. coli*). Плазида, встроенная в бактерию, ведет себя, как вектор (переносчик) нового гена, который реплицируется в каждом новом поколении.

4. Молекулярная селекция — отбор трансформантов, т. е. клонов, несущих рекДНК. В процессе генетической трансформации *E. coli* могут образоваться три типа клеток: клетки, не содержащие плазмиду, содержащие плазмиду без встройки (без рекДНК), содержащие плазмиду с рекДНК. Для отбора трансформантов среди нетрансформированных клеток используют различные маркерные гены, которые находятся в векторной молекуле наряду с трансгеном.

Так, плазида pBR322 имеет два гена устойчивости к антибиотикам ампициллину (Amp^r) и тетрациклину (Tet^r). Один из генов служит для идентификации бактерий, несущих плазмиду (вектор) путем отбора клеток, устойчивых к антибиотик, а другой — для отличия гибридной плазмиды (рекДНК) от исходного вектора. В гене Tet^r имеется уникальный сайт, разрезаемый рестриктазой *Vam*HI. Если разрезать вектор в гене Tet^r рестриктазой *Vam*HI и встроить в него фрагмент чужеродной ДНК, полученный с помощью той же рестриктазы, то ген Tet^r инактивируется, и у бактерий, несущих плазмиду, исчезает устойчивость к тетрациклину, но сохраняется устойчивость к ампициллину. Отбор на среде с ампициллином покажет, содержит *E. coli* плазмиду или нет. Содержащие плазмиду бактерии будут расти на среде с ампициллином. Для отбора клеток, несущих чужеродную ДНК (интересующий нас ген), бактерии выращивают на среде с тетрациклином. Трансформированные клетки устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрацик-

лину (такие колонии отсутствуют на среде с тетрациклином), так как ген устойчивости к тетрациклину разрушен в результате вставки фрагмента чужеродной ДНК. Помимо плазмиды pBR322, используется множество других векторов для клонирования (pUC19, pET, pQE), причем для некоторых из них существуют весьма остроумные системы отбора рекомбинантных клонов (например, окрашивание колонии клеток, содержащих немодифицированную плазмиду pUC19).

5. Выращивание измененных клеток в целые трансгенные организмы. Синтез определенного белка — продукта введенного гена.

Первый, второй и третий из перечисленных этапов представляют собой последовательное создание рекомбинантной ДНК, четвертый и пятый — трансгенез и выявление трансгенного организма.

После введения в реципиентную клетку фрагмента чужеродной ДНК происходит ее клонирование с целью получения большого числа копий или начинается синтез продукта, закодированного во введенном гене. Чаще всего эти процессы осуществляются в бактериальных клетках. Поэтому клонирование прокариотической ДНК в клетках прокариот не вызывает осложнений. Клонирование эукариотической ДНК требует дополнительных методических приемов, так как существуют различия в строении генома у прокариот и эукариот. У прокариот кодирующие домены структурных генов непрерывны, а у эукариот кодирующие области (экзоны) разделены некодирующими (интронами). Прокариоты не способны удалять интроны из первичных РНК-транскриптов, поэтому правильная трансляция эукариотических мРНК в бактериальных клетках невозможна. Для удаления интронов из эукариотической ДНК был предложен метод синтеза *ДНК-копии* (*кДНК*) на мРНК.

4.3. Генетическая инженерия прокариот

Клетки бактерий нашли широкое применение в биотехнологии. Методы генетической инженерии наиболее детально разработаны для микроорганизмов. В связи с этим появилась возможность более эффективно применять их многие

полезные свойства. Используя генно-инженерные методы, можно конструировать микробные клетки, способные синтезировать продукты растительного и животного происхождения, имеющие большое значение для медицины и промышленности. Стало возможным превращать бактерии в своеобразные биологические «фабрики» по производству белковых препаратов, различных химических соединений, аминокислот и т. д.

Бактерии можно использовать как «фабрики» для синтеза белков и новых продуктов, изменяя метаболизм бактериальных клеток введением в них чужеродных генов или модификацией уже существующих; создавать рекомбинантные микроорганизмы, способные синтезировать самые разнообразные низкомолекулярные соединения: аскорбиновую кислоту, краситель индиго, аминокислоты, моноклональные антитела.

В современной биотехнологии широко используют трансгенные микроорганизмы, продуцирующие лекарственные препараты: антибиотики, гормоны, ферменты, витамины; различные препараты для диагностики наследственных и инфекционных заболеваний (например, ВИЧ, вирусного гепатита и др.); для производства незаменимых аминокислот, биодобавок, биополимеров (например, микробиологический синтез каучука), для биodeградации ксенобиотиков.

С помощью трансгенных бактерий можно получать различного рода вакцины:

— субъединичные вакцины, содержащие отдельные компоненты патогенного организма; для их разработки используют технологии рекомбинантных ДНК;

— аттенуированные вакцины, содержащие непатогенные микроорганизмы, синтезирующие антигенные детерминанты определенного патогенного организма, либо штаммы патогенных микроорганизмов, у которых модифицированы или удалены гены вирулентности;

— «векторные вакцины», получаемые в большом количестве путем встраивания генов или их сегментов, кодирующих основные антигенные детерминанты патогенных организмов, в экспрессионные векторы. Продукт используют как вакцину.

Бактериальные клетки применяют также для клонирования необходимых для встраивания генов, проведения фундаментальных исследований и других целей.

В настоящее время бактерия *E. coli* — самая изученная клетка из всех существующих. У большинства наиболее полно изученных фагов клеткой-хозяином является также *E. coli*.

4.4. Генетическая инженерия растений

Трансформация растительного генома

Важным преимуществом растений, по сравнению с животными, является способность их клеток развиваться в целое растение (т. е. тотипотентность), что широко используется в работах по получению трансгенных растений.

Генетическая трансформация растений с помощью методов генетической инженерии может быть осуществлена *векторным способом* (с использованием агробактерий и вирусов) и путем *прямого переноса генов*.

Наиболее изученным примером работы плазмидных векторов служит введение чужеродных генов в геном растений с помощью Ti- и Ri-плазмид почвенных бактерий рода *Agrobacterium*. С помощью этих плазмид бактерии могут интегрировать свой генетический материал в клетки двудольных растений.

Ti-плазида (от англ. tumor inducing — индуцирующая опухоль) обнаружена в клетках некоторых штаммов *Agrobacterium tumefaciens*. Выделенная в чистой культуре, эта бактерия может приводить к образованию опухолей у двудольных растений, что, по существу, может рассматриваться как *природная генно-инженерная система*.

Ri-плазида (от англ. root inducing — индуцирующая корни) присутствует в штаммах *Agrobacterium rhizogenes*.

В 1970-х гг. Дж. Шелл с сотрудниками выявил, что причиной опухолеобразования являются Ti-плазмиды, обнаруженные в клетках некоторых штаммов *A. tumefaciens*. Ti-плазида проникает из клетки бактерии в растение, и часть ее, называемая T-ДНК (от англ. transferred DNA — переносимая), ковалентно встраивается в хромосомы инфицируемого рас-

тения (рис. 4.10). В природе этот фрагмент переносит гены, которые способствуют размножению агробактерий и дают им возможность паразитировать на пораженном растении.

Гены, входящие в состав Т-ДНК, функционируют лишь после их переноса в растительную клетку. Будучи интегрированной с хромосомой, Т-ДНК индуцирует в месте заражения образование опухоли (корончатых галлов, напоминающих раковые клетки животных), гиперпродукцию фитогормонов — цитокининов и ауксина, а также синтез ряда производных аминокислот, опинов — веществ, которых нет в здоровых клетках ни у одного растения.

Опухоль возникает вследствие нарушения баланса фитогормонов, т. е. как результат функционирования онкогенов, продуктами которых являются ауксины и цитокинины. Опины, выделяемые клетками опухоли, бактерия использует в качестве источников углерода и азота для своего роста и размножения. Сама бактерия в клетку не проникает, а остается в межклеточном пространстве и использует клетку со встроенной Т-ДНК как «фабрику», продуцирующую опины. Такие отношения *A. tumefaciens* и растения Дж. Шелл назвал генетической колонизацией, которая представляет собой эксперимент по генетической инженерии, поставленный самой природой.



Рис. 4.10. Генетическая колонизация растения *A. tumefaciens* (по Э.С. Пирузян, 1989):

1 — агробактерии существуют в ризосфере; 2 — строение *A. tumefaciens*; 3 — встраивание Т-ДНК в геном; 4 — образование опухоли

Строение T_i-плазмид хорошо изучено. Они включают в себя:

— T-ДНК — область ДНК, где содержатся гены, ответственные в итоге за морфологию опухоли и синтез фитогормонов, вызывающих неконтролируемый рост опухолевых клеток, а также гены, ответственные за синтез опинов — источников углерода и азота для питания бактерий. Именно все эти гены передаются в ядерный геном растительной клетки;

— *vir*-область — содержит гены, ответственные за вырешение, перенос и интеграцию T-ДНК в хромосомы растений. Индукция этих генов обратима, что очень важно для бактериальных клеток. Если зараженное растение уже больно и является нежизнеспособным организмом, то переноса T-ДНК не происходит;

— *ori*-область — содержит гены, продукты которых обеспечивают репликацию T_i-плазмиды;

— *tra*-область — содержит гены, ответственные за конъюгацию бактерий.

T_i-плазида оказалась идеальным природным вектором для введения чужеродных генов в клетки растения. Проще всего было бы заменить T-ДНК на чужеродные (полезные) гены, ввести их в плазмиды агробактерий и заразить ими растения, так как гены, ответственные за индукцию опухоли, синтез опинов и подавление дифференциации клеток поражаемого растения, расположены близко друг от друга в T-ДНК. В то же время гены, ответственные за перенос и интеграцию T-ДНК в хромосомы растений, находятся в другой области T_i-плазмиды — в *vir*-области.

Итак, на основе T_i-плазмиды в условиях эксперимента создают искусственные векторы. Для создания трансгенных растений гены, кодирующие хозяйственно ценные признаки, встраивают в T-ДНК. Эту же область снабжают маркерными генами (для отбора трансформированных растительных клеток), эукариотическим промотором (например, 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты — *CAMV*) и уникальными сайтами рестрикции.

Однако размеры T_i-плазмид слишком велики и не позволяют использовать их в качестве вектора. Для решения этой проблемы была создана специальная технология — *бинарная система*.

T-ДНК вырезают из T_i-плазмиды и встраивают, например, в плазмиду pBR322, способную к саморепликации в клетках *E. coli*. Таким образом осуществляют клонирование T-ДНК (многократное увеличение числа копий) в составе pBR322. Векторную систему (T-ДНК — pBR322) выделяют из клеток *E. coli* и встраивают в T-ДНК интересующие гены. Новую векторную систему снова размножают в клетках *E. coli*, а затем вводят в клетки *Agrobacterium tumefaciens*, в которых находятся нормальные T_i-плазмиды. В результате гомологичной рекомбинации векторная система и T_i-плазида обмениваются участками T-ДНК. Теперь клетки *Agrobacterium tumefaciens* несут в составе своих плазмид чужеродные гены, которые они могут передать в ядерный геном растительных клеток, что и приводит к созданию трансгенных растений.

В последние годы для создания искусственных векторов используют Ri-плазмиду (от англ. root inducing — индуцирующая корни), присутствующую в штаммах *Agrobacterium rhizogenes*. Ri-плазмиды выгодно отличаются от T_i-плазмид тем, что они являются естественными безвредными векторами. После встраивания T-ДНК в хромосомную ДНК растительных клеток в области заражения наблюдается усиленное образование корешков («бородатость»), из которых легче регенерировать здоровые растения, чем из недифференцированной ткани опухоли.

Для трансформации устойчивых к агробактериям однодольных растений разработаны приемы прямого физического переноса ДНК в клетку. Эти методы достаточно разнообразны: бомбардировка микрочастицами, или баллистический метод; электропорация; обработка полиэтиленгликолем; микроинъекция; перенос ДНК в составе липосом и др.

Наиболее продуктивным и чаще всего используемым является метод бомбардировки микрочастицами.

В последнее время разработан и успешно применен также комбинированный метод трансформации, названный **агролистическим**. При этом чужеродную ДНК вводят в ткани каким-либо физическим методом, например баллистическим. Вводимая ДНК содержит как T-ДНК вектор с целевым и маркерным геном, так и агробактериальные гены виру-

лентности под контролем эукариотического промотора. Временная экспрессия генов вирулентности в растительной клетке приводит к синтезу белков, которые правильно вырезают Т-ДНК из плазмиды и встраивают ее в хозяйский геном, как и при обычной агробактериальной трансформации.

После проведения тем или иным способом трансформации растительной ткани ее помещают *in vitro* на специальную питательную среду с фитогормонами, способствующую размножению клеток. Среда обычно содержит селективный агент, в отношении которого трансгенные клетки приобретают устойчивость. Регенерация чаще всего проходит через стадию каллуса, после чего при правильном подборе сред начинается органогенез (побегообразование). Сформированные побеги переносят на среду укоренения, часто также содержащую селективный агент для более строгого отбора трансгенных особей.

Достижения генетической инженерии растений

Методы генетической инженерии позволяют достаточно быстро создавать новые генотипы растений, т. е. значительно сокращают время, которое затрачивается на классическую селекцию. Кроме того, применение этих методов позволяет изменять генотип целенаправленно. В отношении растений роль генетической инженерии сводится, главным образом, к созданию сортов сельскохозяйственных растений, устойчивых к насекомым-вредителям, фитопатогенам, гербицидам, пестицидам, различным стрессовым факторам. Проводятся работы по введению генов, регулирующих созревание плодов, отвечающих за синтез витаминов или лекарственных препаратов и т. д.

Получение трансгенных растений значительно облегчается благодаря присущему растениям свойству тотипотентности, т. е. способности любой клетки растительного организма регенерировать целое растение. Следовательно, достаточно получить несколько трансформированных клеток, чтобы регенерировать из них растения-трансгены.

Однако возможности генетической инженерии растений ограничиваются рядом причин:

— во-первых, геном растений изучен хуже, чем геном млекопитающих;

— во-вторых, не для всех растений удается подобрать условия регенерации. Стабильно получают растения-регенеранты из протопластов картофеля, люцерны, томатов, моркови, табака, капусты и некоторых других двудольных растений. Регенерировать растения злаков удается не всегда;

— в-третьих, одной из лимитирующих причин служит размер фрагмента донорной ДНК, который предполагается ввести в клетку, а также появление химерных организмов, неспособных к развитию и размножению.

Не так давно была предпринята удачная попытка использовать пыльцу в качестве супервектора при трансформации, что позволяет исключить появление растений-химер. Имеются сообщения об использовании искусственной бактериальной хромосомы в качестве векторной системы, что позволяет переносить целые кассеты генов, кодирующие множественные ступени биохимических процессов. Это открывает такие широкие перспективы в трансформации растительных организмов, что на первое место выходят вопросы о возможных последствиях таких экспериментов и об их экологической безопасности.

Первая волна трансгенных растений, допущенных для практического применения, содержала дополнительные гены устойчивости (к болезням, гербицидам, вредителям, порче при хранении, стрессам).

Нынешний этап развития генетической инженерии растений относится к «метаболической инженерии». При этом ставится задача не столько улучшить те или иные имеющиеся качества растения (как при традиционной селекции), сколько научить растение производить совершенно новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и других областях. Этими соединениями могут быть, например, особые жирные кислоты, полезные белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот, модифицированные полисахариды, съедобные вакцины, антитела, интерфероны и другие «лекарственные» белки, но-

ные полимеры, не засоряющие окружающую среду, и т. д. Использование трансгенных растений позволяет наладить масштабное и дешевое производство таких веществ и тем самым сделать их более доступными.

Изменение пищевой ценности растений

1. *Запасные белки.* Основной задачей генетической инженерии считается улучшение аминокислотного состава белков. Как известно, в запасном белке большинства злаковых наблюдается дефицит лизина, треонина, триптофана, а в запасном белке бобовых — дефицит метионина и цистеина. Введение в эти белки дополнительных количеств дефицитных аминокислот могло бы ликвидировать аминокислотный дисбаланс. Методами традиционной селекции удалось существенно повысить содержание лизина в запасных белках злаковых. Во всех этих случаях часть проламинов (спирторастворимые запасные белки злаковых) заменялась другими белками, содержащими много лизина. Однако у таких растений уменьшались размеры зерен и снижалась урожайность. По-видимому, проламины необходимы для формирования нормального зерна и их замена другими белками отрицательно влияет на урожайность. Поэтому для улучшения качества запасного белка зерновых нужен такой белок, который не только отличался бы высоким содержанием лизина и треонина, но и мог бы полноценно заменить определенную часть проламинов при формировании зерна.

Эксперименты по трансформации пшеницы модифицированным геном, кодирующим одну из субъединиц запасного белка глютеина, привели к активному синтезу модифицированного белка, что способствовало улучшению хлебопекарского качества пшеничной муки.

Растения могут производить и белки животного происхождения. Было показано, что в растениях табака могут собираться полностью функциональные секреторные моноклональные иммуноглобулины. Секреторные иммуноглобулины обычно выделяются в ротовую полость и желудок человека и животных и служат первым барьером на пути кишечных инфекций. Из растений были получены моноклональные антитела, специфичные для *Streptococcus mutans* — бакте-

рий, вызывающих зубной кариес. Предполагается, что на основе таких моноклональных антител, продуцируемых трансгенными растениями, удастся создать действительно антикариесную зубную пасту.

Из других белков животного происхождения, которые представляют интерес для медицины, показана продукция в растениях человеческого β -интерферона.

Разработаны также подходы, позволяющие получать бактериальные антигены в растениях и использовать их в качестве вакцин. Получен картофель, экспрессирующий олигомеры нетоксичной субъединицы токсина холеры. Эти трансгенные растения могут быть использованы для получения дешевой вакцины от холеры.

2. *Жиры.* Важнейшим сырьем для получения разного рода химических веществ являются жирные кислоты — основной компонент растительного масла.

Были получены трансгенные растения рапса с измененным составом растительного масла, включающего, вместе с обычными $C_{16:0}$ и $C_{18:0}$ жирными кислотами, также и до 45 % $C_{12:0}$ жирной кислоты — лауриновой. Это вещество широко используется для производства стиральных порошков, шампуней, косметики.

Интересными представляются эксперименты с петрозелиновой кислотой $C_{18:1}$ — изомером олеиновой кислоты $\Delta^9 C_{18:1}$, у которой двойная связь находится в $\Delta^6 C$ положении. Эта жирная кислота входит в состав масла кориандра и определяет его более высокую температуру плавления ($33^\circ C$), в то время как температура плавления олеиновой кислоты составляет только $12^\circ C$. Предполагается, что после переноса генов, определяющих синтез петрозелиновой кислоты, в растения — продуценты растительного масла удастся производить диетический маргарин, содержащий ненасыщенную жирную кислоту.

Дальнейшее изучение специфики биохимического синтеза жирных кислот, по-видимому, приведет к возможности управлять этим синтезом с целью получения жирных кислот различной длины и различной степени насыщения, что позволит значительно изменить производство детергентов, косметики, кондитерских изделий, затвердителей, сма-

лочных материалов, лекарств, полимеров, дизельного топлива и др.

3. *Полисахариды*. Проводится работа по созданию трансгенных растений картофеля, в которых крахмал будет находиться главным образом в виде амилопектина (разветвленной формы крахмала) или же только в виде амилозы (линейной формы крахмала). Так, например, крахмал, состоящий в основном из амилопектина, по-видимому, будет иметь спрос на рынке производителей различных питательных смесей (сейчас в качестве наполнителя используется модифицированный крахмал).

Создание гербицидоустойчивых растений

Гербициды очень широко применяются в интенсивных сельскохозяйственных технологиях для уничтожения сорняков. Однако гербициды экологически опасны, так как обладают широким спектром действия; они токсичны для млекопитающих и могут накапливаться в растениях и во внешней среде. Еще один существенный недостаток гербицидов: они подавляют рост не только сорняков, но и культурных растений. Кроме того, у многих сорняков отмечено появление устойчивости к различным гербицидам.

Такие высокоэффективные гербициды, как глифосат и триазины, интенсивно изучаются на предмет выявления механизма толерантности к ним некоторых сорняков. Изучение механизма устойчивости к гербицидам с целью получения методами генетической инженерии культурных растений, обладающих этим признаком, включает следующие этапы: выявление биохимических мишеней действия гербицидов в растительной клетке, отбор устойчивых к данному гербициду организмов в качестве источников генов устойчивости, клонирование этих генов, введение их в культурные растения и изучение их функционирования.

Установлено, что признак гербицидоустойчивости является моногенным, т. е. признак детерминируется чаще всего одним-единственным геном. Это облегчает возможность применения технологии рекомбинантной ДНК для передачи данного признака. Таким образом, гены, кодирующие те

или иные ферменты деструкции и модификации гербицидов, могут быть с успехом использованы для создания гербицидоустойчивых растений методами генетической инженерии, поскольку традиционные методы селекции создания сортов, устойчивых к гербицидам, очень длительны и мало-результативны.

Наиболее широко применяемый за рубежом гербицид глифосат (коммерческое название — Roundup) подавляет синтез важнейших ароматических аминокислот (тирозина, фенилаланина и триптофана). Под действием гербицида у неустойчивых к нему растений наблюдаются симптомы азотного голодания (из-за недостатка названных аминокислот), и они погибают в течение двух недель.

Путем переноса гена *cp4* (ген, кодирующий *EPSPS* и несущий точковую мутацию — «мутацию мишени») в геном растений было изменено сродство гербицида с его ферментом-мишенью. В результате гербицид «не узнаёт» свою мишень, фермент сохраняет активность, а растение становится устойчивым к его действию. Таким способом в 1977 г. был получен сорт сои, устойчивый к Roundup. Причем в полученной трансгенетической сое отсутствуют селективные гены устойчивости к антибиотикам, поскольку сам ген устойчивости к глифосату можно использовать в качестве селективного.

К числу наиболее распространенных гербицидов, применяемых при обработке зерновых культур, относится атразин. Он подавляет фотосинтез, связываясь с одним из белков фотосистемы II и прекращая тем самым транспорт электронов. Устойчивость к гербициду возникает в результате точечных мутаций в пластохинон-связывающем белке (замена серина на глицин), вследствие чего он теряет способность взаимодействовать с гербицидом. Химерные растения проявляли значительную устойчивость к таким концентрациям атразина, которые вызывали гибель контрольных растений с геном белка дикого типа.

Ряд гербицидов (паракват, ацифлуофен) ингибирует фотосинтез путем повышения содержания активных форм (радикалов) кислорода. Известно, что нейтрализация супероксиданиона катализируется ферментом супероксиддисмутазой, кодируемой геном *sod*. С целью защиты от гербици-

дов была получена кДНК гена *sod* из табака и введена в геном люцерны, что резко повысило устойчивость растения к этим гербицидам.

Устойчивость к насекомым

Для борьбы с насекомыми-вредителями в растениеводстве используются химические средства — инсектициды. Однако они оказывают вредное воздействие на полезных насекомых, загрязняют окружающую среду; кроме того, насекомые довольно скоро приспосабливаются к ним. Известно свыше 400 видов насекомых, устойчивых к используемым инсектицидам. Поэтому все большее внимание привлекают биологические средства борьбы, обеспечивающие строгую избирательность действия и отсутствие адаптации насекомых-вредителей к применяемому инсектициду.

Давно известна бактерия *Bacillus thuringiensis*, продуцирующая белок, высокотоксичный для многих видов насекомых и в то же время безопасный для млекопитающих. Этот протоксин (Сгу-белок, гены которого локализованы на плазидах) в кишечнике насекомых протеолитически расщепляется и превращается в токсин (δ -токсин, или дельта-токсин), убивая их. Активированный токсин специфично связывается с рецепторами в средней кишке насекомых, что приводит к лизису клеток кишечного эпителия. Взаимодействие токсина с рецепторами строго специфично, что усложняет подбор комбинации «токсин — насекомое».

В природе найдено большое количество штаммов *B. thuringiensis*, чьи эндотоксины действуют только на определенные виды насекомых. Препараты *B. thuringiensis* в течение десятилетий использовали для контроля численности насекомых на полях. Безопасность токсина и его составных белков для человека и других млекопитающих полностью доказана.

Встраиванием гена эндотоксина в геном растений (табак, картофель, томаты, хлопчатник, кукуруза, рис, рапс, тополь и др.) были получены трансгенные растения (Bt-растения — от *B. thuringiensis*), не поедаемые насекомыми (например, картофель, устойчивый к колорадскому жуку), что позволило отказаться от применения инсектицидов (рис. 4.11).



Рис. 4.11. Получение трансгенных растений хлопка с геном *bt*, несущим устойчивость к насекомым (по Л.А. Лутовой, 2000)

В Северной Америке картофель со встроенным геном *cry* ША (с токсичными для колорадского жука свойствами) получил широкое распространение. В настоящее время полевые испытания трансгенного картофеля проводятся в России.

Получены трансгенные растения табака, способные синтезировать токсин. Такие растения устойчивы к поеданию гусеницами *Manduca sexta*: последние погибали в течение трех суток контакта с токсинпродуцирующими растениями. Токсинообразование и обусловленная им устойчивость к насекомым передавались по наследству как доминантный признак.

Трансформация генами эндотоксина, выделенными из генома *B. thuringiensis*, растений томата вызывает у них защитный эффект, сопоставимый с использованием инсектицидных препаратов.

В настоящее время Bt-растения хлопка и кукурузы занимают основную долю в общем объеме производства генетически модифицированных растений этих культур в США.

Повышение устойчивости растений к стрессовым условиям

Растения очень часто подвергаются воздействию различных неблагоприятных факторов окружающей среды: высокие и низкие температуры, недостаток влаги, засоление почв и т. д. Таких факторов множество, поэтому у растений выработались различные способы защиты от них — от физиологических изменений до структурных приспособлений, позволяющих преодолевать отрицательные воздействия.

Имеются определенные возможности для повышения устойчивости растений методами генетической инженерии. Это работа с отдельными генами, контролирующими метаболические ответы растений на стрессовые условия, например сверхпродукцию пролина в ответ на осмотический шок и действие засоления, синтез особых белков в ответ на тепловой шок и т. д.

Важным направлением генетической инженерии является селекция сортов, устойчивых к засухе, жаре, повышенному засолению почвы. Поскольку все эти стрессовые факторы относятся к разряду осмотических, то и подходы по

этим направлениям общие. Чтобы приспособиться к таким условиям, растения синтезируют низкомолекулярные нетоксичные вещества — *осмопротекторы*. Эти вещества способствуют поглощению и удержанию воды, а также предотвращают разрушение макромолекул белков в стрессовых условиях. Идет работа над выявлением, клонированием и переносом в растения трансгенов, кодирующих образование различных осмопротекторов (сахаров, аминокислот, многоатомных спиртов, полиаминов), веществ, регулирующих содержание ненасыщенных жирных кислот в мембранах клеток, и т. д. Исследования показали, что некоторые растения, в частности табак и томаты, не накапливают глицинбетаин (осмопротектор) и поэтому высокочувствительны к солевому шоку. Г. Джиа с соавторами в 2002 г. получил трансгенные томаты, экспрессирующие бетаинальгиддегидрогеназу (БАД, участвующий в биосинтезе глицинбетаина) лебеды *Atriplex hortensis* и проявляющие достаточно высокую устойчивость к солевому стрессу.

С развитием индустриальных технологий стала актуальной разработка методов, позволяющих вести хозяйство в условиях повышенных концентраций в почве тяжелых металлов. Один из подходов к решению этой проблемы — клонирование и встраивание в геном растений гена, кодирующего белок животного происхождения — *металлотиюнеин*, который способен связывать многие тяжелые металлы. Выделен ген, продукт которого связывает кадмий.

Можно отметить косвенный подход к получению морозоустойчивых растений, основанный на генно-инженерных методах работы с бактериями *Pseudomonas syringae* и *Erwinia herbicola*. Исследователи Колорадского университета (США) выявили, что повреждению растений при замерзании способствуют эти бактерии эпифитной (поверхностной) микрофлоры и что их белки служат центрами кристаллизации. Если обезвредить бактерии стрептомицином, то растения не замерзают при температуре -8°C . Но стрептомицин дорог и вреден, поэтому выгоднее было изменить генетику данного штамма бактерий, вырезав из генома определенный ген. Растения, инфицированные мутантным штаммом *Pseudomonas syringae*, росли при отрицательной температу-

ре. Однако оказалось, что бактерии мутантного штамма более живучи и способны вытеснить природный штамм, который, попадая в верхние слои атмосферы, способствует кристаллизации атмосферной влаги. Вероятно, что уничтожение природного штамма и замена его на мутантный могли бы привести к экологической катастрофе, поэтому научные разработки в этом направлении были вовремя приостановлены.

Дальнейшее изучение физиологической, биохимической и генетической основы ответной реакции растения на стрессовые условия среды позволит применять методы генетической инженерии для конструирования устойчивых растений.

Повышение эффективности биологической азотфиксации

Атмосферный азот фиксируется благодаря уникальному ферменту — нитрогеназе. Структура нитрогеназы одинакова у всех азотфиксирующих организмов. Это один из наиболее сложных ферментов, использующих простые субстраты. Непременное условие работы нитрогеназы — защита ее от кислорода, который ингибирует не только активность нитрогеназы, но и ее биосинтез. Кроме азота, нитрогеназа может восстанавливать ацетилен, цианистый водород, закись азота и некоторые другие соединения. Восстановление ацетилена в этилен позволило разработать надежный тест для обнаружения азотфиксирующей активности.

Лучше всех среди азотфиксаторов изучены ризобии, образующие симбиоз с бобовыми растениями, и свободноживущая бактерия *Klebsiella pneumoniae*. Установлено, что у этих бактерий за фиксацию азота ответственно 17 генов — так называемые *nif*-гены. Все они сцеплены друг с другом и расположены в хромосоме между генами, кодирующими биосинтез гистидина (*his*), и генами, ответственными за усвоение шикимовой кислоты (*shiA*).

Гены, кодирующие синтез белковых субъединиц компонентов нитрогеназы, образуют единый оперон HDKY. У быстрорастущей ризобии *nif*-гены существуют в форме мегаплазмиды, содержащей 200–300 т. п. н. В клетках

симбиотических бактерий плазмиды, кроме структурных генов нитрогеназы, содержат гены, отвечающие за развитие корневых клубеньков у определенных видов бобовых.

Конструирование плазмид, несущих *nif*-гены, позволяет передавать способность к фиксации азота организмам, не обладающим этим свойством. Среди бактерий, кроме *E. coli*, такой перенос осуществлен для бактерий *Salmonella typhimurium*, *Erwinia herbicola* и др. Однако подобные манипуляции могут приводить к нежелательным эффектам. Так, перенос генов в штамм *Erwinia* (бактерии, вызывающие гниение растений) может усилить его патогенное действие. Кроме того, существует вероятность случайного переноса вместе с *nif*-генами каких-то нежелательных генов.

В настоящее время внимание ученых привлекают проблемы введения генов азотфиксации в клетки небобовых растений, создания ризоценозов между этими растениями (особенно злаками) и азотфиксирующими организмами, повышения мощности корневой системы бобовых растений для увеличения на ней количества клубеньков. Кроме того, предполагается создание новых азотфиксирующих систем путем введения diaзотрофных микроорганизмов в каллусные ткани растений с последующим образованием из них растений-регенерантов, а также повышение эффективности фиксации азота путем воздействия на гены, контролирующие этот процесс.

Таким образом, наиболее перспективными направлениями являются повышение эффективности фиксации азота в уже существующих природных системах за счет воздействия на гены, контролирующие этот процесс, а также увеличение мощности корневой системы бобовых растений и создание новых азотфиксирующих систем с помощью методов клеточной инженерии.

Повышение эффективности фотосинтеза

C4-растения характеризуются высокими темпами роста и высокой скоростью фотосинтеза, у них практически отсутствует видимое фотодыхание. У большинства сельскохозяйственных культур, относящихся к C3-растениям, высокая интенсивность фотодыхания, в результате чего теряется часть

фотосинтетических продуктов. Фотосинтез и фотодыхание — тесно связанные процессы, в их основе лежит бифункциональная активность одного и того же ключевого фермента — рибулозобисфосфат-карбоксилазы-оксигеназы (РБФК/О). Низкое фотодыхание у С₄-растений объясняется ограничением оксигеназной реакции РБФК/О. Перед генетической инженерией стоит задача исследовать возможности создания растений, у которых РБФК/О будет работать с преобладающей карбоксилазной активностью.

Один из возможных способов увеличения фотосинтеза и, следовательно, продуктивности растений состоит также в клонировании хлоропластных генов в клетках бактерий и их переносе в растения. Известно, что хлоропласты и прокариотические клетки сходны по ряду признаков.

Анализ области хлоропластных генов вблизи последовательности ДНК гена большой субъединицы основного фермента фотосинтеза РБФК/О кукурузы выявил значительные гомологии с известными промоторами и последовательностями ШД (последовательность Шайн — Дальгарно) клеток *E. coli*. Все это привело к попытке клонирования генов хлоропластов в клетках *E. coli*, наиболее часто используемой в генно-инженерных исследованиях.

В настоящее время уже клонировано несколько хлоропластных генов: гены синтеза субъединиц РБФК/О, белка хлорофилл-белкового комплекса, АТФ-синтетазы, цитохрома и др.

Изменение окраски цветков у декоративных растений

Цветоводы во все времена старались создавать растения, цветки которых имели бы более привлекательный внешний вид и лучше сохранялись после срезки. Однако скрещивание растений традиционными методами — это кропотливая работа, требующая много времени и сил и к тому же имеющая свои ограничения.

Так, например, никому не удавалось вывести синюю розу. Голландские ученые методами генетической инженерии создали сорт голубых (синих) роз, перенеся в них ген из дельфиниума, контролирующей синтез голубого пигмента.

Получены и испытываются трансгенные растения хлопка с окрашенным волокном. Предполагается, что в будущем натуральное хлопковое волокно станет крепче, не будет мяться и садиться и будет иметь различную окраску без использования химических красителей.

Растения как биореакторы

Растения дают большое количество биомассы, и их выращивание не составляет особого труда. Поэтому естественно было бы попытаться создать трансгенные растения, способные синтезировать новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и других отраслях. Такими соединениями могут быть, например, особые жирные кислоты, белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот, съедобные вакцины и др. Уже созданы экспериментальные установки по получению с помощью растений моноклональных антител, функциональных фрагментов антител и полимера поли- β -гидроксibuтирата, из которого можно изготавливать пластик, подверженный биодegradации.

Растения являются наиболее дешевыми продуцентами белков. К настоящему времени показано, что растения могут производить белки животного происхождения. Так, встраивание в геном арабидопсиса химерного гена, состоящего из части гена запасного белка арабидопсиса и кодирующей части для нейропептида — энкефалина, приводило к синтезу химерного белка в количестве до 200 нг на 1 г семян. Два структурных белковых домена были связаны последовательностью, узнаваемой трипсином, что давало возможность в дальнейшем изолировать чистый энкефалин, используемый в качестве болеутоляющего и успокаивающего средства.

Японские ученые получили растения картофеля и табака со встроенным геном человеческого α -интерферона, который применяют для лечения гепатита С и некоторых форм рака.

Созданы растения табака, нарабатывающие человеческий интерлейкин 10 (стимулятор иммунитета), а также растения арабидопсиса, синтезирующие витамин Е.

Разработаны также подходы, позволяющие получать бактериальные антигены в растениях и использовать их в

качестве вакцин. Так, получен картофель, продуцирующий нетоксичные субъединицы В-токсина холеры. Такие растения могут быть использованы для получения дешевых съедобных вакцин против холеры. Иммунизация такой антихолерной вакциной вполне эффективно происходит путем перорального приема. Созданы бананы, вырабатывающие вакцину против полиомиелита.

Производство антител и их фрагментов с помощью трансгенных растений имеет ряд преимуществ перед их синтезом в клетках рекомбинантных микроорганизмов, так как трансформация растений носит стабильный характер. Кроме того, процессинг и укладка чужеродных белков в растениях сходны с таковыми в животных клетках. Также можно создавать условия, при которых чужеродные белки будут синтезироваться в семенах, где их целостность не нарушится длительное время.

Крупномасштабный бактериальный синтез поли- β -гидроксибутирата (полимера, из которого получают пластик, подверженный биодegradации) обходится довольно дорого. Поэтому получение этого полимера с помощью трансгенных растений — важный шаг для создания сельскохозяйственных культур, которые можно использовать для получения в больших количествах биодegradирующих пластиков.

Преимущества растений как «биофабрик» очевидны: можно производить очень редкие и дорогие вещества практически в неограниченных количествах; растения становятся продуцентами вакцин, фармакологических белков и антител, что позволяет значительно удешевить лечение различных заболеваний, в том числе и онкологических.

Регуляция сроков созревания и хранения плодов

Благодаря успехам генетической инженерии, можно не только вводить в организм новый чужеродный ген, но и заблокировать (провести адресное разрушение), ослабить (или, наоборот, усилить) действие природного гена.

Например, плоды томата во время созревания содержат значительное количество специального белка-фермента PG (полигалактуроназы), придающего плодам рыхлость. Этот

фермент участвует в разрушении пектина — основного компонента межклеточного пространства растительных тканей. Продукт гена *pg* синтезируется в период созревания плодов томатов, а увеличение его количества приводит к тому, что плоды постепенно теряют упругость, становятся более мягкими и загнивают, что значительно сокращает срок их хранения. Для устранения этого белка (с целью увеличения сроков хранения томатов) проводят отключение гена *pg* путем встраивания в геном томатов антисмысловой конструкции (содержащей перевернутую копию гена) по отношению к этому гену. В результате транскрипции получается антисмысловая (перевернутая) мРНК (так называемая асРНК), которая комплементарно связывается с нормальной (смысловой) мРНК. Образуется молекула двухцепочечной РНК (дуплекс), которая уже не может служить матрицей для синтеза белка.

С применением этого подхода получены первые коммерческие растения томата *Flavr Savr*, отличающиеся пониженной деполимеризацией пектина клеточной стенки плодов, в результате чего они дольше хранились, сохраняя товарные и пищевые качества зрелых плодов, а сами растения были более устойчивы к грибковым заболеваниям.

Генно-инженерный подход применяют и для регулирования сроков созревания томатов. Известно, что этилен — это газообразный гормон, одна из функций которого — контроль над процессом созревания и старения плодов. В качестве мишени в этом случае используют ген *efe* (ethylene-forming enzyme), продуктом которого является фермент, участвующий в биосинтезе этилена. У трансгенных растений уровень этилена был гораздо ниже нормы, поэтому плоды имели более длительный срок хранения.

Данный подход представляет интерес и для обеспечения длительного хранения срезанных цветов.

Повышение урожайности, регуляция скорости роста

С помощью генетической инженерии можно повышать и урожайность сельскохозяйственных культур, несмотря на то что этот признак является полигенным. Тем не менее

можно найти и применить отдельные гены, продукты которых позволяют существенно усилить процессы роста и в итоге повысить продуктивность растения. Так, встраивание в геном картофеля гена фитохрома В от арабидопсиса привело к повышению интенсивности фотосинтеза и увеличению урожая клубней.

По данным ученых Иркутского университета (Р.К. Салдяев и др.), перенос в геном картофеля гена, кодирующего образование фермента УДФГ трансферазы созревающего зерна кукурузы, сопровождался усилением биосинтеза ростовых фитогормонов. Это позволило повысить: урожай клубней — в два раза, уровень сухих веществ в клубнях — до 27 % (у обычных сортов — менее 20 %), аскорбиновой кислоты — до 9 %. Разрезанные клубни не темнели на воздухе. Этими же учеными были получены быстрорастущие трансгенные растения осины путем введения в них генов *ugt* — из кукурузы и *acbp³⁰²* — из арабидопсиса. Продукты этих генов влияют на скорость роста растений через изменение их гормонального (ауксинового) статуса.

Методами генетической инженерии можно добиться повышения качественных и потребительских свойств сельскохозяйственной продукции. Ведутся работы и получены обнадеживающие результаты по созданию кофе без кофеина, табака без никотина (полагают, что курение сигарет из такого табака будет менее вредным для здоровья), арахиса, не содержащего характерных для него аллергенов.

В шлифованном рисе — основном источнике питания в ряде стран — отсутствует провитамин А (β -каротин), что приводит к дефициту витамина А в организме человека и способствует развитию различных заболеваний (например, к ухудшению зрения), особенно у детей. Швейцарским ученым удалось разработать генно-инженерный подход к созданию так называемого «золотого» риса. Они перенесли в геном риса генетическую конструкцию, содержащую сразу три гена от разных организмов, необходимых для биосинтеза β -каротина: гены фитоендесатуразы и ликопин β -циклазы — от нарцисса и ген каротиндесатуразы — от бактерии. Зерна трансгенного риса накапливали в эндосперме провитамин А в достаточном количестве и были окрашены в золотистый цвет.

Ведутся работы по созданию трансгенных растений лесных древесных пород с пониженным содержанием лигнина. В создании низколигниновых деревьев заинтересована целлюлозно-бумажная промышленность, так как лигнин, который составляет 15–35 % от сухого вещества в древесине, при производстве бумаги представляет собой «лишний» компонент, а его удаление — дорогостоящий и экологически опасный процесс.

4.5. Генетическая инженерия животных

Трансформация животного генома

Одними из носителей для введения чужеродной ДНК в животную клетку являются векторы на основе ДНК вирусов (например, SV40, вируса бычьей папилломы и т. д.) или на основе ретровирусов (например, на основе вируса лейкоза мышей) (рис. 4.12). Они легко проникают в клетку хозяина, встраиваются в ее ДНК путем обычной инфекции и обеспечивают высокоэффективный перенос генов. В основном трансформации животных клеток осуществляют либо с помощью ретровирусов (около 40 % от всех трансформаций), либо путем упаковки ДНК в липосомы (25 %), реже используют другие способы.

Все генно-инженерные методы работы с клетками животных можно разделить на две группы: *эксперименты с соматическими клетками* и *эксперименты по трансформации половых клеток*. В последнем случае конечный результат — получение трансгенных организмов.

Генетическая трансформация соматических клеток животных

Культуры трансформированных клеток млекопитающих используют для получения различных веществ. Помимо создания клеток-продуцентов, трансформация соматических клеток млекопитающих позволяет изучать тонкие механизмы регуляции экспрессии генов и целенаправленно модифицировать генетический аппарат клетки животных, а при необходимости и человека, что имеет огромное значение для медицинской генетики.

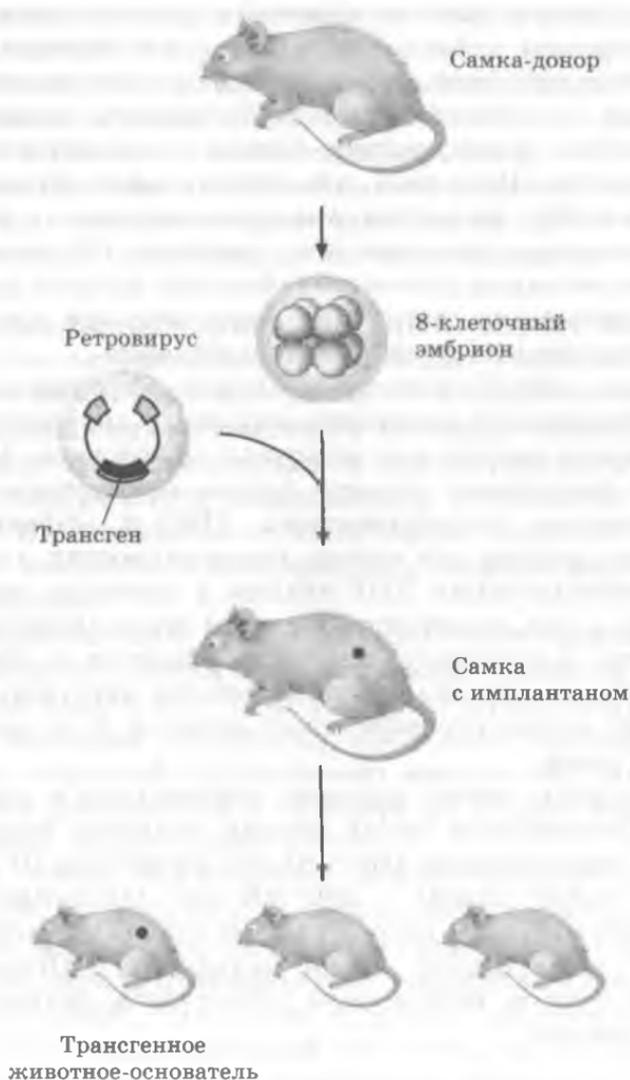


Рис. 4.12. Получение линии трансгенных мышей с использованием ретровирусных векторов (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002). Эмбрион, обычно находящийся на стадии 8 клеток, инфицируют рекомбинантным ретровирусом, несущим трансген. Самки, которым был имплантирован эмбрион, производят на свет трансгенное потомство. Для идентификации мышат, несущих трансген в клетках зародышевой линии, проводят ряд скрещиваний

Хотя культуры клеток животных при массовом выращивании гораздо менее экономичны, чем бактериальные и дрожжевые культуры, они обладают существенным преимуществом — способностью осуществлять мелкие, но весьма важные модификации белков — продуктов гена млекопитающих. Например, для эффективного функционирования ряда белков необходимо присоединение к ним цепочек из молекул углеводов или липидов. Образование и присоединение таких цепочек — обычный процесс для клеток млекопитающих, тогда как бактериальная клетка не способна производить подобные модификации.

Культуры клеток животных служат эффективным источником выделения некоторых вирусных антигенов с целью получения вакцин для животных и человека. Получение таких вакцинных культур клеток осуществимо с помощью техники рекомбинантных ДНК и эффективных векторов экспрессии для клеток млекопитающих и человека. При использовании ДНК-вакцин в организм вводится не антиген, а ген, кодирующий синтез этого антигена. Ген встраивается в плазмиду, плазида вводится в организм путем обыкновенной инъекции, выработка вирусного белка провоцирует синтез специфических антител, т. е. вызывает иммунный ответ.

ДНК-вакцины имеют хорошие перспективы в животноводстве. Достоинством таких вакцин является маленький объем: для иммунизации одной мыши достаточно 10–50 мкг плазмиды, одной коровы — 200–300 мкг. Плазида сохраняется в организме до одного года. В стадии клинических испытаний в настоящее время находятся ДНК-вакцины против микоплазм, возбудителя туберкулеза, сальмонеллеза, лейшманиоза.

Генетическая трансформация половых клеток животных

Если вводить ДНК в клетки многоклеточного организма, то результатом трансформации будет изменение свойств лишь небольшого числа клеток, которые приобрели новый ген. В этом случае животное будет химерным (т. е. клетки разных тканей будут иметь разный генотип).

Следовательно, для изменения свойств всего организма следует изменять геном половых клеток или зиготы, которые передадут новые свойства потомкам. Разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки разных животных, в том числе млекопитающих и мух.

Существует две основные схемы создания трансгенных животных: микроинъекция чужеродной ДНК и введение генетической конструкции в эмбриональные стволовые клетки.

Микроинъекция чужеродной ДНК. Первая попытка была сделана американским ученым Дж. Гордоном в 1980 г. Методом микроинъекции он ввел в оплодотворенную яйцеклетку мыши рекомбинантную плазмиду рBR322, которая содержала ген тимидинкиназы вируса герпеса и фрагмент генома вируса SV40, вызывающего опухолевую трансформацию. В дальнейшем в геном мыши и других животных удалось ввести гены интерферонов, гормона роста человека и ряд других.

Микроинъекцию клонированных генов проводят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки мыши (рис. 4.13). Чаще выбирают мужской пронуклеус. После инъекции яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приемной (суррогатной) матери или дают ей возможность развиваться в культуре до стадии бластоцисты, после чего имплантируют в матку.

Для отбора трансгенных особей (несущих введенный ген) проводят молекулярно-генетический анализ родившегося потомства. Скрещивая трансгенных животных, можно получить чистые (гомозиготные) трансгенные линии.

Недостатком технологии создания трансгенных животных путем микроинъекции генетических конструкций в пронуклеус яйцеклетки является ее трудоемкость и малоэффективность: полного развития достигает менее 1–5 % зигот.

Можно вводить ген в сперматозоиды и затем проводить ими оплодотворение. Таким образом были введены гены интерферона и инсулина человека, ген β -глобина кролика, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса и кДНК вируса лейкемии мышей.

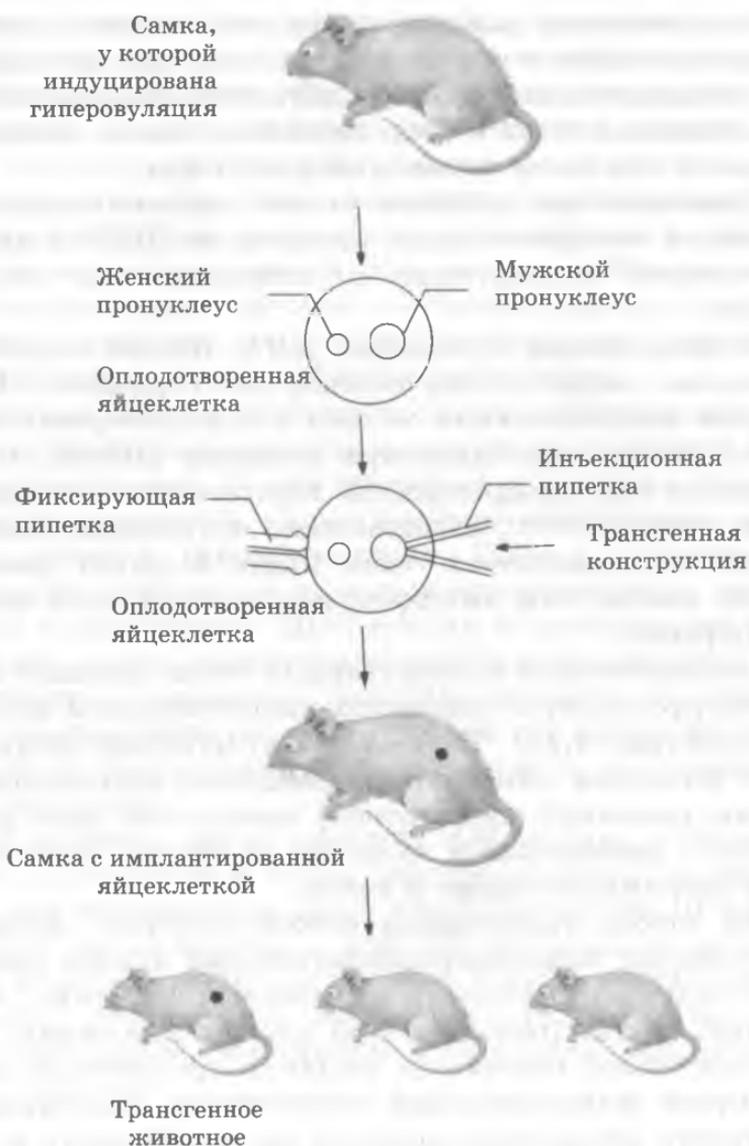


Рис. 4.13. Получение линий трансгенных мышей методом микроинъекций (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002). Яйцеклетки выделяют из самок-доноров, у которых была индуцирована гиперовуляция и проведено спаривание с самцами. Трансгенную конструкцию инъецируют в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Яйцеклетки имплантируют в суррогатную мать, которая производит на свет трансгенных мышат — основателей трансгенных линий

Введение генетической конструкции в эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Впервые культивируемые линии ЭСК из бластоцист мыши (рис. 4.14) были получены Эвансом, Кауфманом и Мартином в 1981 г. Позже аналогичные линии были получены из бластоцист других млекопитающих: золотистый хомячок (1988); свинья, овца (1990); корова, норка (1992); кролик (1993); крыса (1994); обезьяна (1995) и даже человек (1994).

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обычно получают из бластоцист. Когда число клеток (бластомер) эмбриона не превышает восьми, они являются недифференцированными, плюрипотентными (тотипотентными), т. е. способны дифференцироваться в любые типы клеток, включая клетки зародышевой линии, и каждая из них может дать начало новому организму. Эти клетки можно культивировать *in vitro* и после введения в них необходимого трансгена ввести в другой эмбрион на стадии бластоцисты, а затем имплантировать в матку суррогатной матери, производящей потомство. Скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных животных.

В отличие от предыдущего, этот метод позволяет проанализировать встраивание трансгена в геном клетки на стадии бластоцисты и проверить его экспрессию, что дает возможность выбрать линию ЭСК с наилучшими свойствами. Часть этих клеток можно заморозить в жидком азоте и хранить многие годы для последующего создания трансгенных животных.

Такой путь получения трансгенных животных выгоден еще и тем, что используются не зиготы, а бластоцисты. Их легко получить нехирургическим путем из половых путей самок крупных видов млекопитающих и трансплантировать суррогатным матерям для рождения трансгенных животных — основателей трансгенных линий.

Создание трансгенных животных — очень сложный и трудоемкий процесс. По статистике одно трансгенное животное удается получить на 40 инъектированных зигот мыши, на 100 зигот овцы или козы, на 1500 зигот коровы. К тому же это и неоднозначный процесс. Так как интеграция



Рис. 4.14. Получение трансгенных мышей с помощью генетической модификации эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002). ЭСК получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши. Их трансфицируют 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

чужеродных генов носит случайный характер, могут быть повреждены соседние гены реципиента. Из трансгенных животных не более 50 % экспрессируют трансгенный белок, не у всех животных чужой ген попадает в половые клетки, т. е. способен передаваться потомству.

Клонирование животных

Клоном называется популяция клеток или организмов — потомков одной клетки или организма, полученных неполовым путем. Таким образом, все особи в клоне имеют идентичный набор генов и должны быть точной копией взятого для размножения экземпляра (соответствующего прототипа).

У животных можно получить подобные клоны в том случае, когда используемые объекты размножаются путем партеногенеза, т. е. бесполом путем, без предварительного оплодотворения. У нас в стране блестящие работы по клонированию выполнены на шелкопряде академиком В.А. Струнниковым. Выведенные им клоны шелкопряда (партеноклоны мужского пола, дающие на 20 % больше шелка, чем женские) известны на весь мир.

Высшие животные в природе размножаются только половым путем. Клетки животных, дифференцируясь, лишаются тотипотентности. Поэтому для их клонирования в основном используют недифференцированные делящиеся клетки.

Для клонирования животных ядро оплодотворенной яйцеклетки заменяют ядром, взятым от другой особи (с другой генетической информацией). Оказалось, что тотипотентность (возможность развиваться во взрослую особь) сохраняют ядра из клеток очень ранних эмбрионов. Это позволяет проводить искусственное разделение четырех — восьми клеточных эмбрионов на отдельные клетки, культивировать их *in vitro* до стадии бластоцисты и имплантировать в матку суррогатной матери, где они развиваются до рождения. Таким путем можно получать генотипически одинаковые особи (однойяйцевых близнецов).

Сенсационность работы доктора Я. Вильмута и соавторов из Шотландии (1997) заключается в том, что впервые

для клонирования млекопитающих были использованы ядра соматических (дифференцированных) клеток взрослой овцы (клетки соединительной ткани — фибробласты) беломордой породы Финский дорсет, выделенные из вымени овцы (рис. 4.15).

Клонирование овцы осуществлялось методом переноса ядра. Ядро яйцеклетки удаляли с помощью микропипетки. Затем культивировали эпителиальные клетки молочной железы взрослой особи, индуцировали их переход в фазу G_0 и провели слияние клеток в G_0 фазе и яйцеклеток, лишенных ядра овец шотландской черномордой породы. Выращивание восстановленных яйцеклеток осуществлялось в культуре или в яйцеводе до ранних стадий эмбриогенеза, а затем их имплантировали в матку суррогатной матери черномордых овец, где и происходило дальнейшее развитие. В результате появилась всемирно известная овца Долли, генотип и фенотип (беломордый ягненок) которой были полностью идентичны исходной матери. В эксперименте было проведено слияние 277 яйцеклеток с удаленными ядрами с клетками молочной железы в G_0 фазе; из 29 эмбрионов только один развился до жизнеспособного плода.

Перенос ядра соматической клетки в энуклеированную зиготу (безъядерную) успешно проведен на мышах японскими учеными. Имеются сообщения о клонировании свиньи, коровы, кошки. Таким образом, была доказана способ-

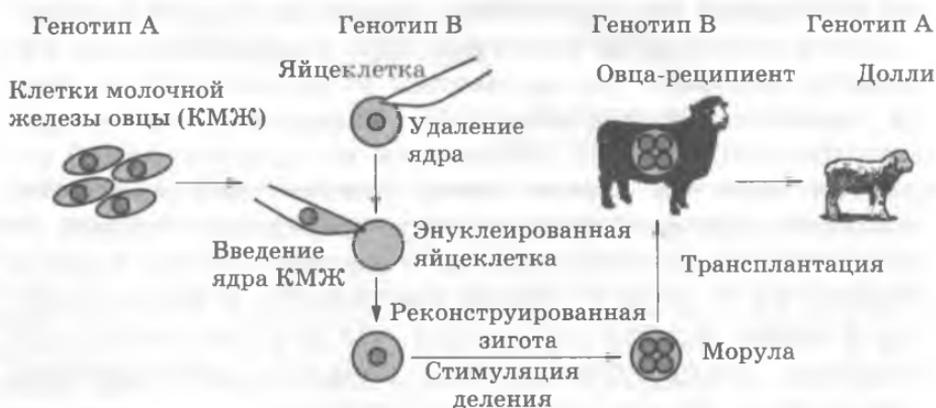


Рис. 4.15. Клонирование овцы методом переноса ядра (по Л.И. Корочкину, 1999)

ность ядер соматических клеток обеспечивать нормальное развитие млекопитающих.

Исследования по клонированию животных имеют фундаментальное значение. Полная схожесть организмов дает возможность сравнивать влияние на них различных препаратов и внешних условий (например, оценивать мутагенность различных химических соединений); выяснить механизмы дифференцировки клеток в процессе онтогенеза и возможность управления этими процессами. Это открывает путь к генотерапии и искусственному созданию органов для трансплантации. Появление клонов важно и для испытания новых лекарств.

Достижения генетической инженерии животных

Трансгенные животные являются удобной моделью для изучения болезней человека, их также планируют использовать для производства необходимых человеку биомедицинских препаратов.

Трансгенные животные как модели наследственных заболеваний человека

Трансгенные линии животных служат для моделирования различных генетических болезней человека, что имеет огромное значение для медицинской генетики. По данным секвенирования генома мыши, у человека содержится около 70–80 % гомологичных генов (генов-ортологов). На мышцах можно получать мутации, осуществлять генно-инженерные манипуляции и изучать механизмы регуляции экспрессии генов, проводить скрещивание трансгенных животных и анализ наследования в потомстве.

На трансгенных животных можно изучать наследственные заболевания мозга и нервной системы. Гены болезни Альцгеймера (отложение белка β -амилоида приводит к образованию бляшек) и гены, отвечающие за развитие эпилепсии и болезней мозга, вводят в геном нормальных животных; при этом получают трансгенных животных-моделей, на которых можно испытывать различные терапевтические препараты.

Трансгенных животных стали использовать для исследования воспалительных и иммунологических заболеваний человека, например ревматоидного артрита. С их помощью моделируют болезни — атеросклероз, мышечную дистрофию (миодистрофия Дюшенна), образование опухолей, гипертонию, сердечно-сосудистые и прионные заболевания и др.

На основе изучения трансгенных животных разрабатывают методы генетической терапии (способы лечения различных наследственных заболеваний). При этом используют соматическую трансфекцию — метод, при котором генетические конструкции вводят в определенные клетки и ткани организма пациента.

Использование трансгенных животных в качестве биореакторов

Самая мощная белоксинтезирующая система находится в клетках молочной железы. Если поставить гены чужих белков под контроль казеинового промотора, то экспрессия этих генов будет мощной и стабильной, а белок будет накапливаться в молоке. Такие трансгенные животные, секретирующие в молоко гормоны, ферменты, антитела, факторы свертывания крови и роста и др., уже начинают использовать как биореакторы, т. е. продуценты биологически активных лекарственных белков человека. Традиционно такие белки выделяли из донорской крови, дефицит которой и низкая концентрация этих белков в ней не позволяют получать необходимое количество препаратов для фармакологии.

Первоначально необходимо получить трансгенное животное, у которого чужой ген экспрессируется в клетках молочной железы и его продукт выделяется в молоко. Для этого создают генетическую конструкцию, содержащую рекомбинантную ДНК трансгена и промотор гена β -казеина — белка, входящего в состав молока. Генетическую конструкцию вводят в зиготу. Причем генетическая конструкция должна работать только в клетках молочной железы и только во время лактации, не оказывая побочного действия на организм трансгенного животного.

В Англии в 1988 г. впервые удалось получить трансгенных овец, продуцирующих с молоком фактор свертывания

крови, необходимый для лечения людей, больных гемофилией. В последующие годы в мире созданы трансгенные мыши, кролики, овцы, козы, свиньи, коровы, в молоке которых секретируются белки человека (ценнейшие фармацевтические вещества) — антитрипсин, антитромбин, белок С, сывороточный альбумин (используемый при операциях), различные моноклональные антитела, эритропоэтин, инсулиноподобный фактор роста, интерлейкины и др.

Уже получены трансгенные коровы, в молоке которых содержится человеческий белок лактоферрин. Этот белок планируют применять для профилактики гастроэнтерологических заболеваний у людей с низкой иммунорезистентностью. Это больные СПИДом, недоношенные младенцы, больные раком, прошедшие радиотерапию.

В России в 1995 г. были предприняты попытки создать овец, продуцирующих химозин. Это ключевой фермент сыроделия, его традиционно выделяют из слизистой оболочки сычуга забитых молочных телят и ягнят.

Интересны и перспективны работы по созданию животных — продуцентов белка паутины пауков, поскольку прочность на разрыв нитей паутины в расчете на площадь поперечного сечения на порядок превосходит прочность стальных канатов. Так, перенеся в геном коз гены паука, отвечающие за выработку белков паутины, американские и канадские генетики получили трансгенных животных, продуцирующих «биосталь» — молоко, содержащее белок, по прочности превосходящий металл.

Использование трансгенных животных позволит снизить стоимость большинства дорогостоящих высокоэффективных препаратов в 10–20 раз и перевести, например, многие лекарства из разряда элитных в число общедоступных.

Трансгенные животные с выключенными генами (генный нокаут)

Генный нокаут (от англ. knock out — выбить) — это направленное разрушение (выключение) определенного гена с помощью гомологичной рекомбинации. Животные-нокауты — удобная модель для исследования функций различных генов.

Сложность генома млекопитающих затрудняет проведение генетического анализа. Большинство исследований в этой области проводилось на мышах — классическом объекте генетики. Создание линий мышей, гомозиготных по направленно инактивированному гену, позволяет изучать детерминируемые данным геном свойства на уровне организма.

Большое значение имеют опыты по созданию животных, продуцирующих молоко, максимально приближающееся по составу к материнскому молоку человека. Для этого нужно выключить несколько генов коровы, т. е. получить животных-нокауты, а затем ввести в ее геном несколько генов человека.

Трансгенные животные — источники органов для пересадки человеку

Трансгенных животных получают и для целей ксенотрансплантации, т. е. как источник органов для пересадки человеку.

Удобным донором органов являются свиньи, так как подходят человеку по строению, размерам и многим биохимическим показателям. Но пересаживать их органы без генетического изменения (трансформации) невозможно, так как они будут немедленно отторгнуты иммунной системой пациента. Чтобы этого не произошло, необходимо создать трансгенную свинью, у которой будут «нокаутированы» соответственные гены гистонесовместимости (тканенесовместимости), а вместо них введены гены гистосовместимости человека. Эти гены располагаются компактно в локусах гистосовместимости, и при проведении генного нокаута можно «выключить» сразу несколько генов. В январе 2002 г. было объявлено о рождении в США пометов трансгенных клонов свиньи с «отключенными» генами гистонесовместимости.

Создание трансгенных свиней, у которых продукты экспрессии генов ингибируют процесс отторжения органов при их пересадке, дает надежду на возможность успешной трансплантации органов животных в организм человека и позволит создать постоянный запас органов для пересадки людям.

Итак, получение трансгенных животных представляет интерес не только для фундаментальных исследований, но и для практического использования. Однако, несмотря на то что первые трансгенные животные были получены более 30 лет назад, до сих пор на рынке нет ни одного генетически модифицированного животного для использования в хозяйственной деятельности. Это связано с определенными техническими (сложность получения и размножения), финансовыми, а иногда и этическими проблемами. Тем не менее успехи генетической инженерии животных очевидны. Разработаны различные методы переноса генов в генетический материал животных и получены трансгенные особи млекопитающих, низших позвоночных и беспозвоночных животных. Ученые научились не только переносить в генетический материал животных отдельные гены, но и «выключать» или заменять некоторые конкретные гены.

4.6. Генодиагностика и генотерапия человека

Генодиагностика — совокупность методов по выявлению изменений в структуре генома. Это относительно новое, перспективное, быстро развивающееся направление диагностики. Диагностические методы обладают высокой специфичностью и чувствительностью, а также достаточно просты и достоверны. Успехи современной медицины во многом зависят от того, насколько рано и точно можно диагностировать наиболее распространенные генетические и инфекционные заболевания, а также новообразования.

Генетическая инженерия ввела в практику ДНК-диагностику. Известно, что участок ДНК, отвечающий за данный биологический признак, имеет определенную нуклеотидную последовательность, которая может служить диагностическим маркером. В основе методов ДНК-диагностики лежит выявление специфических нуклеотидных последовательностей в биологических образцах методом гибридизации (ДНК — ДНК, ДНК — РНК) или полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Эти методы имеют несколько общих этапов:

— денатурация ДНК-мишени; фиксация полученной одноцепочечной молекулы ДНК-мишени на мембранном фильтре;

— инкубация мембранного фильтра с одноцепочечной молекулой ДНК-зонда, которая при определенной температуре и ионной силе спаривается с ДНК-мишенью;

— промывание фильтра для удаления избытка не связанных меченых молекул ДНК-зонда;

— определение наличия гибридных молекул ДНК-мишень/ДНК-зонд с помощью радиоавтографического метода.

Гибридизация нуклеиновых кислот основана на использовании зондов, применяемых для выявления комплементарных последовательностей (искомого участка ДНК). Для обеспечения высокой точности диагностического теста гибридизационные ДНК- и РНК-зонды должны быть высокоспецифичными. Специфичность зондов проявляется на разных уровнях: на видовом (различают два или более видов), на уровне отдельных штаммов в пределах одного вида, на генетическом уровне (различают разные гены).

Использование метода полимеразной цепной реакции ПЦР для мультипликации тестируемой ДНК обеспечивает также высокую чувствительность этих зондов.

В настоящее время получены и охарактеризованы более ста различных ДНК-зондов. Зонды применяют для:

— обнаружения генов или нуклеотидных последовательностей, специфичных для возбудителя инфекционного заболевания;

— обнаружения в тканях единичных клеток патогенных штаммов: хламидий, вируса гепатита С, возбудителей туберкулеза и др.;

— диагностики наследственных заболеваний путем нахождения специфических изменений в генах. Подобные зонды существуют для диагностирования более 1000 наследственных заболеваний, в том числе фенилкетонурии, серповидной анемии, дефицита α -антитрипсина, мышечной дистрофии, болезни Альцгеймера, мусковисцидоза, гемофилии и др.

Преимущества ДНК-диагностики — быстрота, надежность, высокая чувствительность и специфичность. Методы ДНК-диагностики имеют широкую перспективу развития, с их помощью в принципе можно выявлять на ранних стадиях заболевания практически любые патогенные микроорганизмы и определять многообразие наследственных заболеваний.

Генетическая терапия

Большие перспективы в лечении наследственных заболеваний человека открывает *генетическая терапия (генотерапия)*. Она позволит устранить генетические дефекты (коррекция наследственных патологий) путем введения в соматические клетки полноценных (функционально активных) генов вместо (или помимо) поврежденного (мутантного) гена, а также лечить различные заболевания за счет введения в организм чужеродной генетической информации с целью получения терапевтического эффекта.

Принципиальный смысл генетической терапии заключается в замещении мутантного белка (с которым связано развитие болезни) клеток человека на соответствующий нормальный белок, который будет синтезироваться в клетках. То есть генотерапия направлена на компенсацию нарушенных функций клетки на генетическом уровне. Причем таким способом возможно лечение не только генетических, но и других (неинфекционных и инфекционных) заболеваний (рак, СПИД и т. п.), поэтому методы генетической терапии различны.

Существует два типа генотерапии: заместительная и корректирующая. *Заместительная генотерапия* заключается во вводе в клетку неповрежденного гена, когда болезнь связана с отсутствием или малым количеством белкового продукта. В клетку вводится неповрежденный ген, и создаются условия для его экспрессии (наряду с экспрессией мутантного гена) с целью получения достаточного количества нормального белка-продукта. Внесенная копия заменит по функциям сохранившийся в геноме больного дефектный ген. Все проводимые сегодня клинические испытания используют внесение в клетку дополнительных количеств ДНК.

При *корректирующей генотерапии* предполагается замена дефектного гена нормальным в результате рекомбинации. Пока этот метод проходит стадию лабораторных испытаний, и его эффективность еще очень низка.

В зависимости от способа введения экзогенных ДНК в геном пациента, существует два принципа лечения:

— *генетическая терапия ex vivo* (рис. 4.16). Так называемый «терапевтический» ген переносят в изолированные клетки больного с помощью ретровирусных векторов, трансдуцированные клетки культивируют *in vitro* и снова вводят в организм больного человека;

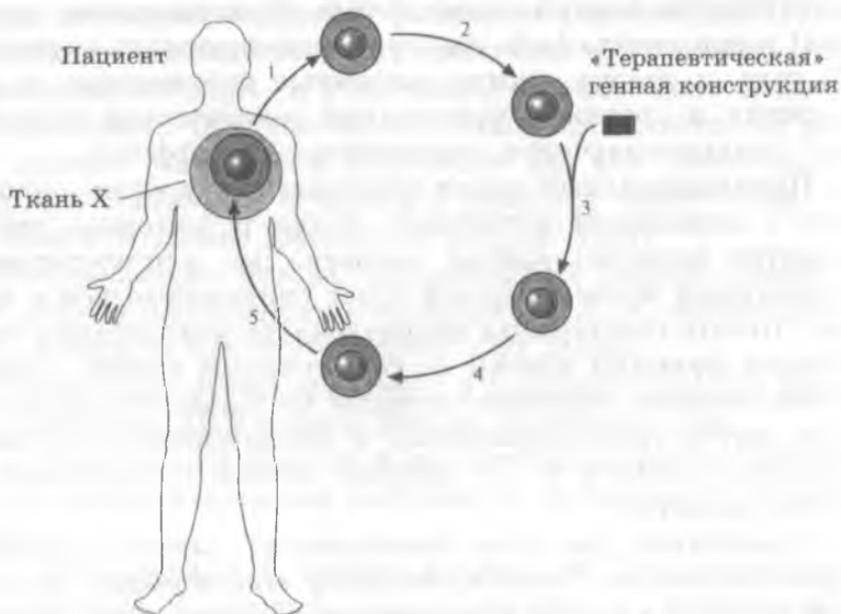


Рис. 4.16. Схематическое представление генной терапии *ex vivo* (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002). Процедура включает:

1 — получение от пациента клеток с генным дефектом; 2 — культивирование изолированных клеток; 3 — трансфекцию «терапевтической» генной конструкции в изолированные клетки; 4 — отбор, выращивание и тестирование трансфицированных клеток; 5 — трансплантацию и трансфузию трансфицированных клеток пациенту

— *генетическая терапия in vivo* (рис. 4.17). Введение «терапевтического» гена непосредственно в клетки ткани-мишени пациента с помощью вирусных векторов или путем инъекций чистой ДНК, биобаллистики, введения липосом.

Для переноса генов чаще всего используют относительно легко доступные клетки: фибробласты, лимфоциты, клетки печени — гепатоциты, эндотелиальные и мышечные клетки, стволовые клетки костного мозга. Такие клетки легко извлекаются из организма, затем в них можно включить необходимую генетическую конструкцию, провести отбор и

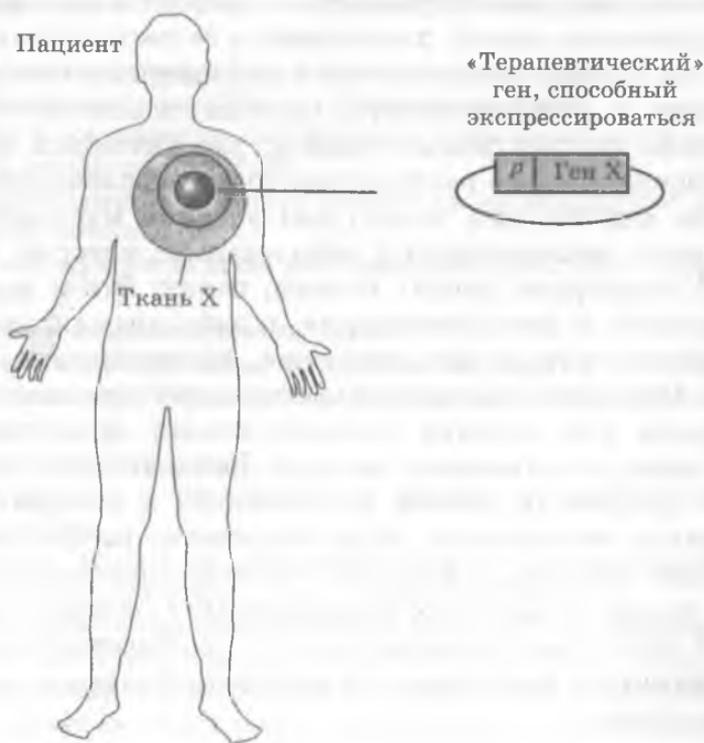


Рис. 4.17. Схематическое представление генной терапии *in vivo* (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002). Клонированный «терапевтический» ген (ген X) кодирует белок, корректирующий генетический дефект. Этот ген доставляется к клеткам определенной ткани пациента с наследственным заболеванием и экспрессируется в них. Промотор *p*, под контролем которого осуществляется транскрипция, тканеспецифичен

культивирование *in vitro* трансформированных клеток, после чего вновь ввести их в организм больного. При этом у реципиента не развивается нежелательного иммунного ответа. Однако это сложная и дорогостоящая процедура.

В настоящее время в клиниках экспериментируют с Т-лимфоцитами (острый комбинированный иммунодефицит, вызванный дефектом в гене *ada*), миобластами (мышечная дистрофия Дюшенна: дефект в гене дистрофина), фибробластами (гемофилия — дефекты в генах факторов IX или VIII), клетками эпителия бронхов (муковисцидоз — дефект в гене *cf*-трансмембранного фактора) и гепатоцитами (семейная гиперхолестеринемия — дефект в гене рецептора липопротеинов низкой плотности).

В том случае, когда клетки с дефицитным геном нельзя извлекать и культивировать, проводят трансгенез *in vivo*. Это очень перспективный подход, рассчитанный на массовое лечение широко распространенных заболеваний, однако пока он апробирован только для лечения муковисцидоза.

Список наследственных заболеваний, которые пытаются или планируют лечить генами, велик. Это и ревматоидный артрит, и фенилкетонурия, и заболевания, связанные с недостатком гормонов (инсулина, эритропоэтина, гормона роста). Огромные перспективы открывает использование генотерапии для лечения онкологических заболеваний. По мере усовершенствования методов доставки генов и контроля их экспрессии список заболеваний, к которым можно применять генотерапию, будет безусловно расширяться.

Таким образом, в будущем генетическая терапия может стать одним из ведущих направлений в лечении наследственной патологии человека в связи с возможностью исправлять функции генетического аппарата больного, нормализуя его фенотип.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ К ГЛАВЕ 4

1. Кем и когда были открыты нуклеиновые кислоты?
2. Кто впервые предложил двунитиевую структуру ДНК и в каком году это произошло?
3. Назовите дату основания генетической инженерии.
4. Расскажите о строении нуклеиновых кислот.

5. В чем значение принципа комплементарности для молекулы ДНК?
6. Что такое трансгеноз и трансгенные организмы?
7. Что такое рекомбинантная ДНК? ее значение?
8. Перечислите этапы создания рекомбинантной ДНК.
9. Какие ферменты участвуют в создании рекомбинантной ДНК?
10. Что такое плазмидный вектор? Какими свойствами он обладает?
11. Назовите особенности разных типов векторных систем.
12. Перечислите этапы создания трансгенных растений.
13. Какие технологии прямого переноса генов в клетки используются для получения трансгенных микроорганизмов, животных, растений?
14. Перечислите особенности строения геномов прокариотической и эукариотической клеток.
15. В чем состоит сущность технологии синтеза кДНК?
16. Каково значение кДНК в клонировании генов?
17. Что такое геномные библиотеки и в чем заключается их отличие от библиотек кДНК?
18. Перечислите особенности технологии амплификации нуклеиновых кислот.
19. В чем состоит отличие амплификации ДНК от ее клонирования?
20. Что такое секвенирование ДНК?
21. В чем состоит значение гибридизационных ДНК- и РНК-зондов?
22. Расскажите о возможностях использования трансгенных организмов.
23. Что такое плазмиды?
24. Расскажите о разновидностях плазмид и выполняемых ими функциях.
25. Можно ли считать синонимами формулировки «трансформированное растение» и «трансгенное растение»?
26. Что такое селективные и маркерные гены? Расскажите о них.
27. Для каких целей используют гены селективных маркеров при проведении агробактериальной трансформации клеток?
28. От каких факторов зависит эффективность агробактериальной трансформации?
29. Перечислите достижения в области генетической инженерии растений.
30. Перечислите достижения в области генетической инженерии животных.
31. Что такое генодиагностика и генотерапия?
32. Чем отличаются генетическая терапия *ex vivo* от генетической терапии *in vitro*?

Глава 5

КОЛЛЕКЦИИ И КРИБАНКИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

В условиях глобального экологического неблагополучия особую актуальность приобрела проблема сохранения биоразнообразия. Серьезные опасения вызывает и стремительное сокращение числа видов животных и растений на Земле, а потеря биологического разнообразия — это потеря ценного генофонда и, соответственно, устойчивости экосистем.

По оценкам экологов, каждый час с планеты исчезает один биологический вид, что с точки зрения генетической инженерии означает безвозвратную потерю от 1 тыс. до 10 тыс. генов. Предполагают, что к 2015 г. число живых объектов на Земле может уменьшиться на 20 %. Все это вызывает большую тревогу и ставит перед биотехнологами задачу решения проблемы сохранения биоразнообразия растений на нашей планете.

5.1. Сохранение организмов и клеточных культур

Необходимость сохранения и восстановления генетических ресурсов дикорастущих растений способствовала принятию в 1992 г. в Рио-де-Жанейро международной Конвенции по сохранению биологического разнообразия (ратифицирована Россией в 1995 г.). Глобальная стратегия по сохранению растений была принята на Шестой встрече в рамках Конференции Сторон по Конвенции о биологическом разнообразии, проведенной в Гааге в 2002 г. В связи с этим в «Стратегию ботанических садов России по сохранению биоразнообразия растений» (Москва, 2002 г.) был включен раздел об организации банков семян и вегетативно размножаемых форм растений.

Наиболее полноценно генофонд дикорастущих видов сохраняется в природных популяциях на охраняемых территориях — в заповедниках, национальных парках, ботанических садах и т. д. Однако этих традиционных средств сохранения биологического разнообразия растений уже давно недостаточно из-за присущих им ограничений.

Одним из эффективных способов сохранения живых объектов, в том числе микроорганизмов и культур клеток, является поддержание их в коллекциях, о которых еще недавно было распространено представление как о месте «складирования» хаотическим образом собранных штаммов. Сейчас же коллекции находятся в эпицентре научных исследований, поскольку содержат не только культуры, но и значительные объемы полезной научной информации. Во многих странах мира наблюдается Ренессанс коллекционного дела, и коллекции приобретают все большую ценность. Нельзя забывать и о том, что их наличие является необходимым условием развития биотехнологии во всех промышленно развитых странах. Например, устойчивое функционирование крупных национальных коллекций микроорганизмов необходимо для исследовательских и прикладных целей. В то же время содержание коллекции — это трудоемкое и дорогостоящее дело. Согласно подсчетам, стоимость создания и сохранения в течение 25 лет коллекции из 3 тыс. микроорганизмов составляет 4 млн долларов США.

Во многих странах создаются национальные программы по сохранению природного богатства генетических фиторесурсов, и обязательным их компонентом является создание банков зародышевой плазмы (germplasm): семян, меристем, пыльцы, зародышей, культур тканей и клеток и другого генетического материала. Долговременное хранение геномов (зародышевой плазмы) позволяет собрать и сохранить без потери жизнеспособности генетически полноценное морфологическое, физиолого-биохимическое, адаптационное богатство природной внутривидовой изменчивости.

Одна из актуальных задач современной эволюционной биологии заключается в создании системы генетических стандартов. Это связано с тем, что каждый генотип может эволюционировать при наличии не менее 80–90 % объема генетической информации.

Возникла также необходимость надежного сохранения в неизменном состоянии штаммов тканей и клеток, являющихся продуцентами веществ народнохозяйственного значения. Это вызвано тем, что клеточные штаммы используют вместо природного растительного сырья на биотехнологических заводах, и создание банка продуцентов, хранящихся необходимый промежуток времени в биологически полноценном состоянии, оградит производство от риска их потери.

В настоящее время разработана биотехнология для поддержания и хранения генофонда ценных видов растений. Ее основой являются методы культивирования *in vitro* клеток, тканей, меристем, зиготических и соматических зародышей растений. Однако это довольно трудоемкий процесс, поскольку требует значительных затрат ручного труда, энергии и реактивов. В связи с этим учеными разрабатываются технологии, способствующие снижению экономических затрат. К их числу можно отнести:

- замедление роста объектов;
- сушку;
- криосохранение.

Для замедления роста объектов служат следующие способы:

- хранение под слоем минерального масла (применяют для бактериальных и грибных культур, иногда — для клеточных культур высших растений);
- изменение газового состава и атмосферного давления внутри культурального сосуда;
- изменение светового режима;
- охлаждение до температуры прекращения активного роста;
- использование гормональных (для растительных клеток часто применяют хлорхолинхлорид) и осмотических (маннит в концентрации 3–6 %) ингибиторов;
- замена в питательных средах CaCl_2 на $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$;
- индукция клубнеобразования в пробирках (позволяет сохранить генофонд, например картофеля).

Сушка, применяемая для сохранения объектов, может быть проведена в вакуумсушильных шкафах, в распылительной сушилке, которая позволяет пневматически распы-

лить раствор до мельчайших капель в камере с потоком нагретого воздуха.

Наиболее часто используют лиофильную сушку. Метод лиофилизации основан на том, что температура кипения воды при давлении 4,6 мм рт. ст. составляет 0 °С, а при давлении 0,034 мм рт. ст. понижается до -50 °С. При этой температуре вода замерзает, и поэтому процесс упаривания представляет собой типичную возгонку.

Принцип проведения лиофильной сушки весьма прост. Водный раствор полностью замораживают в тонком слое и выдерживают в вакууме при давлении 0,01–2 мм рт. ст. Благодаря быстрому испарению воды, замороженный раствор постоянно охлаждается. Удаляемые водяные пары улавливают в охлаждаемых ловушках или с помощью поглотителей. Таким способом можно полностью высушить продукт за пару часов.

Основные преимущества метода лиофильной сушки состоят в том, что:

- в процессе упаривания объект находится при низкой температуре. Это особенно важно для обезвоживания белков, антибиотиков, вирусов, микроорганизмов и нестабильных фармацевтических продуктов;
- лиофилизация не сопровождается вспениванием;
- во время всей операции объект находится при низкой температуре, следовательно, нет опасности его микробиологического разрушения, а ферментативное расщепление сведено до минимума;
- нет опасности окисления нестабильных веществ кислородом воздуха, поскольку работу проводят при относительно глубоком вакууме;
- полученные объекты содержат около 0,5 % влаги, благодаря чему их можно хранить длительное время, не опасаясь разрушения или заражения.

5.2. Криосохранение и его основы

Термин «криосохранение» (cryopreservation), т. е. хранение объектов при очень низкой температуре (обычно при температуре жидкого азота, которая составляет -196 °С),

употребляется для обозначения сложного многоэтапного процесса, обеспечивающего неограниченно долгое хранение живых клеток, тканей и органов в состоянии анабиоза. Основным критерием криосохранения служит обратимое ингибирование процессов жизнедеятельности. Только в состоянии глубокого анабиоза, когда полностью останавливаются обменные, биохимические реакции и отсутствует жидкая фаза, создаются условия для длительного хранения биологической системы с последующим полным возвратом ее к исходному состоянию в условиях нормотермии.

Единственно надежным средством для решения этой задачи является глубокий холод (-140°C и ниже), обеспечиваемый применением жидкого азота.

Важнейший этап процесса криосохранения — замораживание. В настоящее время известны два метода криосохранения: программное (медленное) и сверхбыстрое замораживание. *Программное* замораживание изучается уже давно, поэтому его довольно широко применяют при сохранении животных и растительных клеток. *Сверхбыстрое* замораживание разрабатывается сравнительно недавно, однако считается, что за этим методом будущее.

На этом этапе возникают трудности, так как существует две группы объектов, подвергаемых криосохранению:

— ткани, содержание воды в которых минимально (пыльца, ортодоксальные семена). Для таких объектов процесс замораживания достаточно прост: их можно погружать непосредственно в жидкий азот и оттаивать впоследствии на воздухе в обычных условиях;

— большинство растительных тканей. Для них характерны большие размеры клеток, прочная целлюлозная стенка и наличие центральной вакуоли. Причем именно степень вакуолизации клетки (оводненность) играет основную роль в устойчивости к действию низких температур. Для таких объектов прием простого замораживания мало эффективен, так как не происходит сохранения всех исходных свойств и жизнеспособности.

При проведении работ по криосохранению клеток растений, особенно культивируемых в условиях *in vitro*, следует отбирать мелкие клетки с маленькой вакуолью и пониженным

содержанием воды. Необходимо разрабатывать в каждом отдельном случае условия замораживания и последующего оттаивания. Это связано с двумя повреждающими факторами, проявляющимися при замораживании. Первый из них — лед, он возникает сначала в растворе вокруг клеток; второй — дегидратация клеток, вызываемая формированием кристаллов этого внеклеточного льда. Поэтому необходимо с наименьшей потерей жизнеспособности миновать при замораживании-оттаивании зону между температурой защитного раствора и температурой $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (в редких случаях — до $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$). Именно в этой температурной зоне проявляется действие обоих повреждающих факторов замораживания, каждый из которых опасен потому, что способен вызвать деструкцию внешней клеточной мембраны — плазмалеммы и, следовательно, гибель клеток.

Первая задача криосохранения — предотвратить образование кристаллов льда внутри клеток. В случае клеток растений она решается труднее, чем для других объектов, вследствие обилия в них свободной воды. Эту трудность можно преодолеть за счет снижения скорости охлаждения или предварительным обезвоживанием клеток. Известно, что чем больше воды в клетке, тем меньше должна быть скорость замораживания. С другой стороны, предварительное обезвоживание клеток может вызвать их повреждения, связанные с дегидратацией.

Вторая задача криосохранения — ослабить стрессовые воздействия, вызванные неизбежной дегидратацией. Для этого необходим определенный состав смеси протекторов и оптимальная скорость замораживания. Желательна также оптимизация всей программы процесса криосохранения.

При проведении планомерных фундаментальных и прикладных исследований выясняют механизмы криоповреждений и криозащиты биологических систем разных уровней организации. Рассмотрим некоторые из них:

1. *Предотвращение образования внутриклеточного льда.* В большинстве случаев клетка погибает при образовании льда в протопласте, поскольку для ее структур безопасны лишь кристаллы льда размером не более $0,1\text{ }\mu\text{m}$.

При быстром понижении температуры (20 °С/мин) в протопласте образуются очень мелкие кристаллы льда, которые являются центрами кристаллизации. Они быстро растут, присоединяя молекулы воды из протопласта. Образующиеся большие кристаллы льда способны механически повредить клетки, в основном мембраны и клеточные структуры.

При медленном замораживании (в парах жидкого азота или в специальных программных замораживателях) лед образуется в первую очередь в межклетниках. Известно, что менее концентрированные растворы, находящиеся в них, замерзают быстрее. По мере охлаждения кристаллы льда, возникшие в апопласте, растут за счет воды. Лед формирует градиент водного потенциала, направленный из клеток в межклетники. Это постепенно приводит к дегидратации клеток и, как следствие, к денатурации белков, нарушению функционирования мембран, увеличению концентрации ионов до токсических величин, нарушению синтеза нормальных клеточных белков.

Образование внеклеточного льда и связанный с этим отток воды из клеток стимулируются специальными веществами, которые клетки выделяют в апопласт. Такие соединения называются **нуклеаторами**, а сам процесс — **нуклеацией**. Эти вещества выполняют роль центров кристаллизации воды (затравок), тем самым повышая порог зародышеобразования льда. Благодаря нуклеаторам, лед в межклетниках образуется при более высокой температуре, чем те температуры, которые требуются для замерзания внутриклеточной среды.

Таким образом, постепенная дегидратация протопласта является одним из необходимых условий выживания клеток при замораживании.

2. Биологические антифризы. В клетках некоторых растений синтезируются высокомолекулярные соединения, тормозящие процессы нуклеации и роста кристаллов льда. Эти соединения получили название **биологических антифризов**. Они препятствуют внеклеточному образованию льда, особенно в тех органах и тканях, клетки которых

должны сохранить максимальное количество воды и находиться в переохлажденном состоянии (почки и меристемы). Известны антифризы белковой, гликопротеиновой и полисахаридной природы.

Таким образом, с помощью антифризов возможно осуществление блокады роста кристаллов льда.

3. Накопление сахаров и других совместимых осмолитов. Снижение содержания воды в клетках при образовании внеклеточного льда и сопутствующее дегидратации увеличение концентрации ионов в цитоплазме вызывают различного рода нарушения в структуре и функциях биополимеров, в частности происходит денатурация белков и подавляется их ферментативная активность, изменяется структура липидного бислоя мембран и нарушается их целостность. Деструктивные изменения в мембранах, в свою очередь, приводят к нарушению внутриклеточной компартментации веществ.

Регуляция осмотического давления в клетках при холодной дегидратации осуществляется преимущественно за счет биосинтеза низкомолекулярных органических соединений, которые получили название **осмолитов**. Они хорошо растворимы в воде, нетоксичны, не вызывают изменений в метаболизме, отчего и получили второе название — **совместимые вещества**. Это могут быть моно- и олигосахариды, многоатомные спирты, аминокислоты, бетаины, амины и белки.

Наряду с осморегуляцией, эти вещества выполняют еще одну очень важную при дегидратации функцию. Она может быть определена как защитная (протекторная) по отношению к биополимерам цитоплазмы. Подчеркивая двойную роль осмолитов, их часто называют **криопротекторами** (от греч. *kryos* — холод и лат. *protector* — покровитель, защитник).

Наиболее известны такие криопротекторы, как диметилсульфоксид (ДМСО), различные сахара, глицерин, этиленгликоль, пролин. Все они делятся на две группы — проникающие и не проникающие в клетки, хотя это деление достаточно условно. Так, глицерин может проникать в клетку при комнатной температуре или выступать как не проникающее соединение, если его добавлять при 0 °С.

Криопротекторы, синтезируясь в клетках при пониженных температурах, могут предотвратить или резко замедлить рост кристаллов льда. Чем выше концентрация раствора, тем ниже точка его замерзания. При накоплении, например, растворимых сахаров в клетке, во-первых, понижается водный потенциал цитоплазмы и снижается точка ее замерзания, что препятствует образованию внутриклеточного льда; во-вторых, сахара повышают осмотическую концентрацию клеточного сока, способствуя увеличению водоудерживающей силы клеток и тем самым защищая их от обезвоживания при образовании внеклеточного льда; в-третьих, сахара защищают белки от денатурации, наступающей вследствие сближения макромолекул при дегидратации, а также повышения концентрации токсичных веществ.

Таким образом, гидрофильные белки, моно- и олигосахариды, обладающие криопротекторным эффектом, способны связывать значительные количества воды. Связанная таким образом вода уже не замерзает и не транспортируется. Считается, что белки и углеводы, обладающие криопротекторным эффектом, способны стабилизировать другие белки и клеточные мембраны при дегидратации клеток.

4. Изменение состава мембранных липидов и текучести мембран. Дегидратация клеток оказывает непосредственное воздействие на структурное состояние липидов мембран. Мембраны в норме связывают до 30–50 % воды клетки. Взаимодействуя с заряженными и полярными группами белков и фосфолипидов, вода стабилизирует структуру мембран.

Основной причиной повреждающего действия низких температур на клетки является нарушение функционирования клеточных мембран из-за их затвердевания, связанного с фазовыми переходами, поскольку при достаточно низких температурах липидные бислои ведут себя как твердые тела. При температуре выше фазового перехода структура бислоя сохраняется, при этом жирные кислоты «плавятся», в результате чего вращение и скручивание молекул происходит легче, чем при низких температурах.

Различная реакция на низкие температуры определяется в первую очередь различиями в составе жирных кислот, входящих в состав мембранных фосфолипидов. Когда в

фосфолипидов велико содержание насыщенных жирных кислот (таких, как пальмитиновая и стеариновая), для таких мембран характерны более высокие температуры фазового перехода. При этом они становятся менее текучими, что нарушает функционирование многих белков: каналов, переносчиков, рецепторов, ферментов и т. п. Выявлено, что увеличение количества ненасыщенных жирных кислот (таких, как линоленовая и линолевая) в составе мембран приводит к снижению температуры фазового перехода мембранных липидов, и как результат увеличивается текучесть таких мембран.

Сильная дегидратация может стать причиной нарушения связи между липидами и белками мембран. При внеклеточном образовании льда в мембранах появляются участки, не содержащие белков.

Таким образом, главной мишенью криоповреждений клеток растений является плазмалемма. Рост толерантности к замораживанию связан с изменениями ее характеристик, в том числе состава липидов и их ненасыщенности.

5. Абсцизовая кислота. Важная роль в адаптации клеток растений к низким температурам принадлежит фитогормону АБК (абсцизовая кислота). Было обнаружено, что АБК накапливается в растениях при различных неблагоприятных воздействиях (водном дефиците, повышенной концентрации солей, пониженной температуре и т. д.). Поскольку АБК играет важную роль в адаптации растений к стрессам, это соединение получило название **гормона стресса**.

На многих растениях из разных систематических групп показано увеличение внутриклеточной концентрации АБК при пониженных температурах, причем у разных видов степень увеличения была различна.

Дегидратация сопровождается значительным повышением концентрации гормона в растительных тканях и синтезом в них новых белков. Активность многих генов и белков, которые экспрессируются при низкой температуре или водном дефиците, может быть индуцирована обработкой АБК.

Таким образом, накопление АБК в ткани при пониженной температуре приводит к экспрессии ряда генов и появлению криопротекторных белков.

6. Окислительный стресс. При низких температурах наблюдается интенсивное образование АФК (активных форм кислорода) в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и апопласте. При продолжительном холодовом воздействии на клетки уровень АФК повышается во многих компартаментах, в клетке накапливается перекись и развивается окислительный стресс.

Важный фактор устойчивости клеток к низкотемпературному воздействию — функционирование мощной антиоксидантной системы. В эту противоокислительную систему входят высокомолекулярные (ферменты — супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатион-редуктаза), а также низкомолекулярные (аскорбат, токоферол, глутатион, фенольные соединения) антиоксиданты. При низкотемпературном стрессе активность антиоксидантных ферментов значительно возрастает, увеличивается и содержание низкомолекулярных антиоксидантов. Все это способствует снижению повреждения клеток при воздействии низких температур.

Способы подготовки к глубокому замораживанию. Известно, что устойчивость клеток к замораживанию зависит от их исходного морфофункционального состояния, которое определяется особенностями культивирования, фазой роста и т. д. Так, клетки в стационарной фазе обладают наиболее высокой устойчивостью. Можно подвергать замораживанию клетки и в логарифмической фазе роста, тогда для них необходимо подобрать оптимальную скорость охлаждения, иногда возникает необходимость в применении криопротекторов. При проведении работ по криосохранению необходимо прежде всего учитывать специфику растительных клеток, отбирать мелкие клетки, с маленькой вакуолью и пониженным содержанием воды.

Физиологические подходы к процессу криоконсервации разнообразны. Один из них — стадия культивирования перед криоконсервированием. От состава среды культивирования в ряде случаев зависит криоустойчивость организмов. Изменение соотношения углерода и азота в среде культивирования, введение в нее жирных кислот, солей кальция либо других компонентов меняет криочувствительность организмов, выращенных в этих условиях. В свя-

зи с этим было предложено предварительное культивирование клеток растений в определенных условиях.

Отмечено положительное влияние на криоустойчивость как краткой инкубации клеток при пониженной температуре, так и закаливания — естественной подготовки морозоустойчивых клеток. Закаливание суспензий клеток проводят, постепенно снижая температуру культивирования и одновременно увеличивая концентрацию сахарозы в среде, затем добавляют и разные криопротекторы. Однако способность к закаливанию генетически детерминирована.

Другой физиологический подход подготовки к криосохранению основан на снижении водного потенциала среды за счет добавления в нее осмотически активных веществ — криопротекторов. Среди известных криопротекторов выделяются такие легко проникающие в клетки вещества, как диметилсульфоксид (ДМСО, 5–10 %), глицерин (10–20 %), а также непроникающие высокомолекулярные — поливинилпирролидон (ПВП), декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 6000.

Криопротекторами могут также служить сахароза, трегалоза и смеси этих растворов. Кроме того, предварительное культивирование с маннитом и сорбитом (в концентрации 2–6 %) способствовало уменьшению растяжения клеток. Положительный эффект такой подготовки к криосохранению связан со снижением оводненности клеток.

Следующий способ подготовки связан с физиологической ролью некоторых эндогенных аминокислот при различных стрессах, обусловленных водным дефицитом. В первую очередь это пролин, чье значение для связывания воды в клетках растений широко известно. Для этих целей применяют также аланин, аспарагин, серин, глицин, γ -аминомасляную кислоту.

Известно, что образование стрессовых белков, обуславливающих устойчивость к низким температурам, регулируется фитогормоном АБК. В результате воздействия экзогенной АБК возможно добиться увеличения морозоустойчивости и формирования защитных механизмов у растительных объектов, что является существенным для целей криоконсервирования.

При наблюдении за клетками под криомикроскопом четко видно, как идет образование внутриклеточного льда, находящегося в прямой зависимости от степени переохлаждения, скорости замораживания, наличия или отсутствия центров инициации кристаллизации раствора, окружающего клетки.

Большое значение при криосохранении имеет правильно подобранный режим замораживания. Так, при криосохранении клеток, тканей растений и микроорганизмов целесообразно применять программное замораживание с инициацией кристаллизации и скоростью охлаждения на первом этапе замораживания $0,25-1,0$ °C/мин (до -40 °C), на втором этапе — увеличивать скорость до $9-10$ °C /мин и при достижении около -60 °C быстро погружать их в жидкий азот.

Эту работу проводят на специальном оборудовании, обеспечивающем программное замораживание. Такие приборы выпускает специальное конструкторское технологическое бюро с опытным производством при Институте проблем криобиологии и криомедицины (г. Харьков).

Этап **удаления криопротекторов и рекультивирования** требует особых предосторожностей, так как выжившие клетки перенесли сильнейший стресс и частично повреждены. Для их сохранения необходимо свести к минимуму все воздействия, которые могут дополнительно повредить клетки и плазмалемму. Однако криопротекторы должны быть удалены. Был предложен физиологичный, щадящий способ для интенсификации процесса рекультивирования, основанный на диффузии криопротекторов из клеток в жидкую среду после высева суспензии клеток на фильтры, расположенные на поверхности раствора. Это позволяет менять раствор, не тревожа клетки, чтобы избежать дополнительного стресса, и тем самым интенсифицировать рекультивирование.

Для определения жизнеспособности клеток после оттаивания применяют наиболее простой, быстрый и вполне удовлетворительный способ: окраску витальным красителем ($0,1\%$ -м раствором феносафранина или $0,25\%$ -м раствором синьки Эванса), при которой мертвые клетки окрашиваются, а живые нет. Окончательным критерием жизнеспособности клеток, безусловно, служит четкое возобновление их роста и деления при рекультивации на искусственных питательных средах после оттаивания.

Таким образом, если к моменту глубокого замораживания клеточные штаммы сохраняли способность к регенерации, то и после криосохранения также имеется возможность регенерировать эти растения, независимо от сроков их хранения в жидком азоте, так как восстанавливать рост клеточных культур можно спустя годы, а эмбриогенные и морфогенетические потенции при криосохранении не изменяются при условии, что режим хранения не был нарушен, т. е. температура никогда не превышала -140°C , а все этапы криоконсервирования были достаточно оптимизированы. Следовательно, криосохранение фактически является консервацией в состоянии *анабиоза (криобиоза)*, когда все процессы жизнедеятельности прекращены, но при правильном оттаивании и рекультивировании их можно возобновить и «оживить» биологические объекты.

Однако требуется дальнейшая исследовательская работа по подбору оптимальных условий для обеспечения выживания клеток при криосохранении. Необходимо учитывать морфофизиологические и генетические особенности клеток, способность их к закаливанию, степень проницаемости клеточных мембран; правильно подбирать смесь криопротекторов, скорость снижения температуры при замораживании и, соответственно, условия оттаивания.

Технология, связанная с криосохранением растительных объектов, развивается и постоянно совершенствуется. Несомненно, что она имеет свое будущее, поскольку уже сегодня криобанки, основанные на методе криосохранения, могут значительно облегчить работу селекционеров, предоставив им возможность широко использовать пул генов сортов, в том числе старой селекции, а также диких и исчезающих видов растений.

5.3. Криобанки

Проблема надежного и неограниченно длительного хранения организмов с наименьшими затратами и на минимальной площади решается за счет использования *криобанков*. Это направление биотехнологии стало развиваться с

начала 1970-х гг. Для спасения исчезающих видов в дополнение к традиционным способам было предложено хранить в жидком азоте семена, апексы, эмбриониды и клетки, культивируемые *in vitro* и способные регенерировать растения. Криобанки семян сельскохозяйственных культур и их дикорастущих сородичей существуют в развитых странах уже около 40 лет.

Проблема хранения генофонда растений и их клеточных штаммов стала, в сущности, проблемой криосохранения семян, апексов побегов, эмбрионов и клеток *in vitro*. Апексы *in vitro*, в отличие от клеток, регенерируют исходный генотип и обеспечивают не только сохранение сортов, форм и видов, вегетативно размножающихся и других растений, но и клонирование отдельных элитных экземпляров.

Благодаря сохранению криоконсервированного генофонда, селекционерам в любое время может быть предоставлен генотип, имеющий искомые признаки: необходимую пыльцу для проведения гибридизации; уникальные и единичные семена, в том числе не выносящие обезвоживания; трансформированные, мутантные, гибридные клетки разных видов растений, способных к морфогенезу *in vitro*; зиготические и соматические зародыши и т. д.

Кроме того, создание на биотехнологическом производстве запасов посевного криоконсервированного материала с высокой специфической активностью позволяет добиваться получения стандартного высокоактивного продукта, исключить потери, связанные со снижением специфической активности на различных этапах схем наработки посевного материала. Приемы криоконсервирования можно использовать также на стадии хранения особо ценного продукта.

Хранение материала в жидком азоте практически не лимитировано. Например, в криобанке Института физиологии растений РАН хранятся клетки моркови, которые находятся в жидком азоте около 25 лет, меристемы картофеля — более 10 лет и др.

Уже разработаны способы криосохранения для культивируемых клеток более 30 видов, полученных из растений (13 видов), каллусных культур (около 10 видов), изолированных протопластов (8 видов), меристем (25 видов, в числе

которых земляника, наперстянка, ромашка, малина, гвоздика, картофель) и кончиков стебля (13 видов). Из них 14 штаммов — продуценты экономически важных веществ (рис. 5.1, см. цв. вклейку). Полное восстановление роста культур получено после 25 лет хранения. Возобновленные культуры сохранили все свои основные характеристики, клетки картофеля, моркови и меристемы регенерировали растения. В криобанке хранятся также семена более 100 видов охраняемых растений, собранных сотрудниками разных институтов на территории от Балтики до Курил.

Таким образом, криосохранение — современный, надежный способ длительного хранения клеточных штаммов, тканей и микроорганизмов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что вам известно об условиях, в которых наиболее полноценно сохраняется генофонд дикорастущих видов растений и животных?
2. Какие способы сохранения живых объектов вам известны?
3. Сколько стоит создание и сохранение коллекции микроорганизмов?
4. Какие технологические подходы используют для снижения экономических затрат при сохранении генофонда растений?
5. Какие способы применяются для замедления роста объектов?
6. Расскажите о методе лиофильной сушки и его применении.
7. Дайте определение термина «криосохранение».
8. В чем сущность понятия «криоконсервация»? Каково его биологическое значение?
9. Перечислите методы, используемые при криосохранении объектов.
10. Какие организмы или их ткани и клетки могут служить объектами криоконсервации?
11. Почему замораживание является важнейшим этапом процесса криосохранения?
12. Какие задачи стоят при проведении криосохранения живых организмов?
13. В чем сложность замораживания растительных клеток, по сравнению с клетками животных и микроорганизмов?
14. Сравните, как влияет на клетки внеклеточный и внутриклеточный лед, образующийся при замораживании объектов.

15. Как предотвратить образование внутриклеточного льда?
16. Расскажите о биологических антифризах.
17. Какие изменения в метаболизме живых организмов происходят при криосохранении?
18. Что такое криопротекторы?
19. Какова функциональная роль криопротекторов при подготовке живых объектов к криосохранению? В чем заключаются особенности их применения?
20. Сравните технологии быстрого и медленного замораживания и перспективы их применения.
21. Какие изменения происходят в мембранах клеток при низких температурах?
22. Какой фитогормон играет важную роль при адаптации клеток к низким температурам и в чем его значение?
23. Перечислите этапы технологического процесса криоконсервации и расскажите о них.

Глава 6

ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ И ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Все живые организмы на нашей планете образуют различные соединения первичного метаболизма, такие, как углеводы, белки, липиды, витамины и другие вещества, необходимые для роста и развития. Их содержание и состав зависят от генетических характеристик объектов, стадии онтогенеза и условий произрастания.

Помимо первичных метаболитов, у некоторых организмов (преимущественно растений) осуществляется синтез так называемых вторичных метаболитов, к которым относятся алкалоиды, терпеноиды, стероиды, фенольные соединения, цианогенные гликозиды и др. (рис. 6.1). Эти низкомолекулярные вещества во многих случаях характерны для определенных видов растений, а их синтез в значительно большей степени видоспецифичен, чем синтез первичных метаболитов.

Все это свидетельствует о чрезвычайном разнообразии соединений, образуемых живыми организмами. Многие из них имеют важное народнохозяйственное значение и поэтому являются целевыми продуктами биотехнологических производств.

Обмен веществ клетки подчиняется сложнейшей системе регуляции. Задачей же биотехнолога является обеспечение сверхсинтеза необходимых для практических целей продуктов метаболизма, что достигается путем изменения как регуляторных систем метаболизма, так и генетических программ.

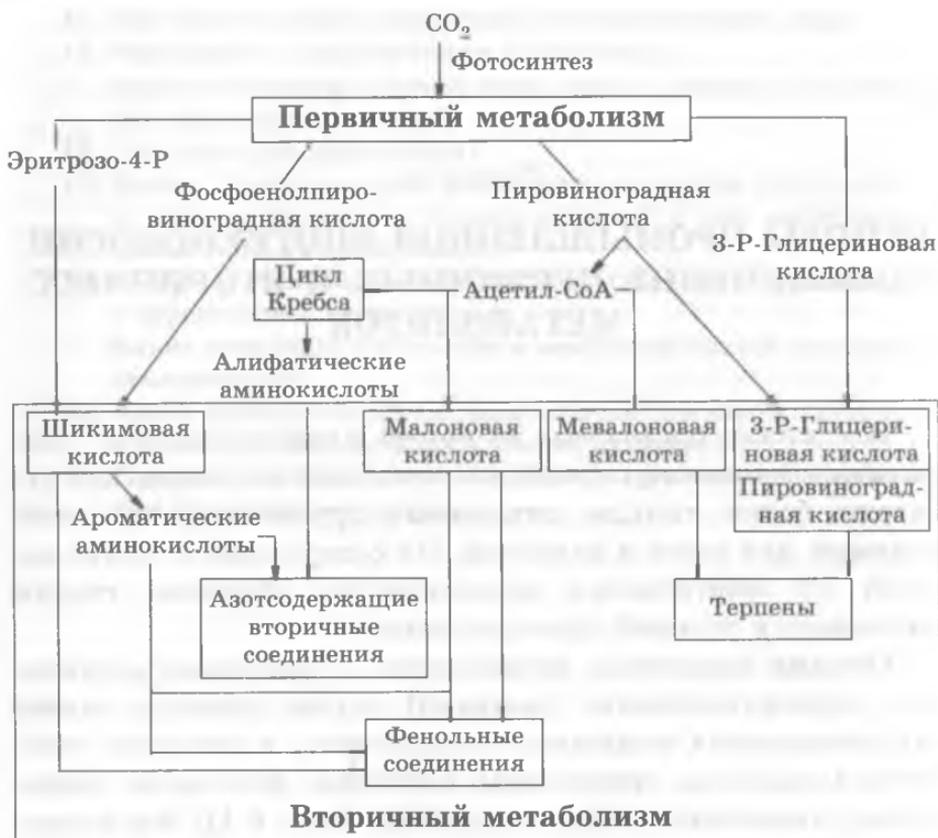


Рис. 6.1. Основные пути синтеза вторичных соединений и их связь с первичным обменом веществ (по С.С. Медведеву, 2004)

6.1. Основные методы и подходы, используемые в промышленной биотехнологии

Как мы уже говорили, биотехнология — это целенаправленное получение ценных продуктов за счет использования биохимической деятельности микроорганизмов, изолированных клеток или их компонентов.

Преимущества биотехнологических производств:

— возможность получения специфичных и уникальных природных веществ, часть из которых (например, белки, ДНК) еще не удастся получать другим путем (например, химическим синтезом);

- проведение биотехнологических процессов при относительно невысоких температурах и давлениях;
- высокие скорости роста и накопления биомассы;
- использование в качестве сырья дешевых отходов сельского хозяйства и промышленности;
- биотехнологические процессы обычно экологичны, дают меньше вредных отходов и близки к протекающим в природе естественным процессам;
- технология и аппаратура биотехнологических производств просты, а также недороги.

Продукты биотехнологии получают по индивидуальным технологиям, используя для этого определенные биологические агенты, сырье, число стадий производства и их технологические режимы, которые могут сильно варьировать. В то же время для всех биотехнологических производств существует типовая схема.

К определяющим факторам биотехнологического процесса относят:

- вид используемого биотехнологического процесса;
- субстрат с его биохимическими и биофизическими характеристиками;
- аппаратуру, включая систему контроля управления;
- технологический режим и соответствие требованиям ГОСТа.

Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства коммерческих продуктов используют клеточные системы или микроорганизмы, обычно включает *три ключевые стадии*:

- подготовительную (обработка сырья, используемого в качестве источника питательных веществ, и приготовление, если это необходимо, питательных сред);
- биотехнологическую (рост микроорганизмов-мишеней в большом — обычно объемом более 100 л — биореакторе (ферментация) с последующим образованием нужного метаболита, например антибиотика, аминокислоты или белка (биотрансформация));
- получения готовой продукции (очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы).

Подготовительная стадия необходима для приготовления сырья, используемого в биотехнологическом процессе. В зависимости от целевого продукта, при этом предусматриваются:

— *приготовление среды*, включающей необходимые компоненты питания для организмов, и ее стерилизация (для асептических биотехнологических процессов, при которых нежелательно попадание посторонней микрофлоры);

— *подготовка и стерилизация газов* (обычно воздуха) путем очистки от пыли, влаги и присутствующих в воздухе микроорганизмов, включая споры;

— *подготовка посевного материала*, в том числе культивирование микроорганизмов, изолированных клеток растений или животных;

— *подготовка биокатализатора* — либо фермента в свободном или закрепленном на носителе виде, либо биомассы микроорганизмов, выращенных до состояния, в котором проявляется их ферментативная активность;

— *предварительная обработка сырья*, если оно поступает в непригодном для непосредственного использования в биотехнологическом процессе виде. Например, при получении спирта пшеницу сначала дробят, а затем подвергают ферментативному процессу «осахаривания». Другой пример — использование древесины для получения дрожжей: ее сначала измельчают, а затем подвергают нагреву до 200 °С в кислой среде. В результате кислотного гидролиза происходит превращение древесины в раствор глюкозы и лигнин. Раствор глюкозы (гидролизат) как раз и используют в биотехнологическом процессе для получения кормовых дрожжей.

Биотехнологическая стадия — основная в биотехнологическом производстве. Именно на этой стадии с использованием того или иного биологического агента (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов или клеточных органелл) происходит преобразование сырья в тот или иной целевой продукт.

Главной целью является получение определенного органического вещества. Однако биотехнологическая стадия, как правило, включает не только синтез новых органических соединений, но и ряд других биотехнологических процессов, таких, как:

— *ферментация* — процесс, осуществляемый с помощью ферментов культивируемых микроорганизмов;

— *биотрансформация* — процесс изменения химической структуры вещества под действием ферментативной активности клеток или готовых ферментов;

— *биокатализ* — химические превращения вещества, протекающие с использованием биокатализаторов-ферментов;

— *биоокисление* — окисление 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 в твердых отходах;

— *биосорбция* — сорбция вредных примесей из газов или жидкостей (обычно осуществляется закрепленными на специальных твердых носителях микроорганизмами);

— *бактериальное выщелачивание* — процесс перевода нерастворимых в воде соединений металлов в растворенное состояние под действием специальных микроорганизмов;

— *биодеградация* — разрушение вредных соединений, осуществляемая микроорганизмами-биодеструкторами.

Обычно биотехнологическая стадия завершается выходом одного жидкостного и одного газового потоков, иногда — только одного жидкостного или переработанного твердого продукта, например при созревании сыра или биокомпостировании отходов.

Получение готовой продукции — заключительная стадия технологического процесса биотехнологического производства. Чаще всего целевой продукт находится либо в самой биомассе, либо в жидкости. В зависимости от свойств биомассы и жидкости, для их разделения могут быть использованы различные методы:

— *отстаивание* — разделение под действием гравитационных сил (обычно при очистке сточных вод);

— *фильтрация* — пропускание суспензии через фильтрующий материал, на котором задерживаются частицы твердой фазы — биомасса. Такой способ применяют в про-

изготовлении антибиотиков, особенно в тех случаях, когда микроорганизм-продуцент имеет мицелиальный характер;

— *сепарация, центрифугирование* — разделение под действием центробежных сил. Наиболее часто используют для отделения дрожжей или бактерий в производстве кормовой биомассы;

— *микрофльтрация, ультрафльтрация* — пропускание суспензии через мембраны с весьма малым размером пор, обеспечивающее удерживание клеток микроорганизмов на мембране и получение чистого раствора. При ультрафльтрации отделяются не только клетки, но и крупные молекулы растворенных веществ;

— *коагуляция* — добавление в суспензию реагентов, способствующих образованию и осаждению более крупных клеточных частиц и отделению их от жидкости методом отстаивания;

— *флотация* — захват микроорганизмов пузырьками пены и выделение их из пенной фракции.

Целевые продукты биосинтеза могут быть внеклеточными и внутриклеточными.

Для внутриклеточных продуктов сначала необходимо разрушить оболочку клеток. Это можно осуществить *дезинтеграцией клеток*, разрушив клеточную оболочку физическими методами (с помощью мелющих тел, путем замораживания и продавливания, воздействием ультразвуком, методом декомпрессии — резкого сброса давления) или химическими и биотехнологическими методами. Используют также *гидролиз* (разрушение клеточных оболочек под действием химических реагентов и температуры), *ферментолиз* (разрушение клеточных оболочек под действием ферментов при повышенной температуре) или *автолиз* (разновидность ферментолиза, когда используют собственные ферменты клетки).

После проведения какой-либо из вышеперечисленных операций дальнейшее выделение целевого продукта осуществляют методами, общими для внеклеточных и внутриклеточных продуктов. Основными из них являются:

— *экстракция* — переход целевого продукта из водной фазы в не смешивающуюся с водой органическую жидкость (экстрагент). Наиболее известно выделение жироподобных веществ жидкими углеводородами (типа бензина). приме-

няют и многие другие виды экстрагентов (хлороформ, эфир, бутилацетат). Иногда экстракцию осуществляют непосредственно из биомассы микроорганизмов;

— *осаждение* — выделение целевого продукта путем добавления к жидкости реагента, взаимодействующего с растворенным продуктом и переводящего его в твердую фазу;

— *адсорбция* — перевод растворенного в жидкости продукта в твердую фазу путем его сорбции на специальных твердых носителях (сорбентах);

— *ионный обмен* — в твердую фазу переходят ионы (катионы или анионы), а не молекула целевого продукта или примеси;

— *отгонка, ректификация* — выделение растворенных в культуральной жидкости легкокипящих продуктов, например этилового спирта;

— *ультрафильтрация, нанофильтрация и обратный осмос* — выделение высокомолекулярных соединений (белков, полипептидов, полинуклеотидов). Обратный осмос и нанофильтрация позволяют отделять даже небольшие по размеру молекулы;

— *центрифугирование, ультрацентрифугирование* — выделение вирусов, клеточных органелл, высокомолекулярных соединений.

Очистка необходима для получения биопродуктов высокой степени чистоты. Основной целью является удаление примесей, что достигается с помощью экстракции, адсорбции, ионного обмена, ультрафильтрации, обратного осмоса, ректификации и ферментолиза, которые были рассмотрены ранее. Кроме перечисленных, используют и другие процессы, такие, как:

— *хроматография* — процесс, напоминающий адсорбцию. На твердом сорбенте собираются растворенные вещества, часто близкие по структуре (например, смеси белков, нуклеотидов, сахаров, антибиотиков). При адсорбции они десорбируются вместе, а вот при хроматографии они выделяются из сорбента как бы по очереди, что позволяет отделить их друг от друга;

— *диализ* — процесс, в котором через полупроницаемую пленку могут проходить низкомолекулярные вещества, а высокомолекулярные остаются. Путем диализа осу-

ществляют очистку вакцин и ферментов от солей и низкомолекулярных растворимых примесей;

— *кристаллизация* — процесс, основанный на различной растворимости веществ при разных температурах. Медленное охлаждение позволяет формировать кристаллы из растворов целевых продуктов, причем чистота их обычно очень высока. Таким образом, например, получают кристаллы пенициллина. Можно даже получить еще более чистый продукт, если кристаллы растворить в воде или растворителе, а потом снова кристаллизовать (т. е. провести процесс *перекристаллизации*).

Концентрирование продукта повышает его выход. Известно, что после биотехнологической стадии содержание продукта обычно составляет примерно 0,1–1 %, после стадии отделения биомассы — 0,1–2 %, после стадии выделения — 1–10 %, после стадии очистки — 50–80 % и, наконец, после стадии концентрирования — 90–100 %.

На стадии концентрирования применяют такие процессы, как выпаривание, сушка, осаждение, кристаллизация, фильтрация, ультрафильтрация, гиперфильтрация или нанофильтрация, обеспечивающие как бы отжим растворителя из раствора.

Получение готовой формы продукта завершает биотехнологическое производство. Продукт приобретает товарную форму за счет проведения процессов *гранулирования* (формирование гранул из порошка или прямо из раствора), *дражирования*, *таблетирования* (формирование драже, таблеток), *розлива* или *фасовки*, *ампулирования* (затаривания в ампулы).

6.2. Технологическое оборудование промышленного назначения

Для культивирования различных биологических объектов, в том числе микроорганизмов и культур клеток, в зависимости от поставленных задач используют различное технологическое оборудование. Это могут быть качалки и роллеры — при лабораторных исследованиях, биореакторы и ферментеры — при промышленных производствах.

В лабораторных условиях часто используют качалки и роллерные установки, вращение которых предотвращает се-

диментацию (осаждение) клеток и обеспечивает достаточную концентрацию растворенного кислорода. В большинстве случаев скорость вращения составляет 50–120 об/мин для круговых качалок и 1–20 об/мин — для роллерных установок. Несмотря на различные способы перемешивания клеточных культур, отличия в продуктивности и росте клеток незначительны.

Промышленное выращивание клеток растений осуществляют в биореакторах или ферментерах. Их подразделяют на две группы: по конструкции и по принципу перемешивания культуральной жидкости (рис. 6.2).



Рис. 6.2. Упрощенные схемы биореакторов различных типов (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002):

А — реактор с механическим перемешиванием; Б — барботажная колонна; В — эрлифтный реактор с внутренней циркуляцией; Г — эрлифтный реактор с внешней циркуляцией. Стрелки указывают направление потока культуральной среды

В биореакторах, относящихся к *первой группе*, перемешивание клеток происходит путем аэрирования воздухом. Это *барботажный* тип биореактора, при котором процесс перемешивания суспензии осуществляется поднимающимися пузырьками воздуха. В случае барботажных биореакторов обычно получают хорошие ростовые характеристики для большого числа клеточных культур. Однако сложность поддержания суспензии в гомогенном состоянии при высоких концентрациях биомассы клеток сужает сферу их применения.

Несколько больших значений максимальной концентрации клеточной биомассы можно достичь при применении *эрлифтных* биореакторов, в которых создаются направленные циркуляционные потоки. В эрлифтных биореакторах перемешивание суспензии осуществляется за счет применения специальной конструкции, создающей градиент плотности (как правило, это конструкция с внутренним цилиндром).

Вторая группа биореакторов представляет собой аппараты с применением *механических перемешивающих устройств*. Биореакторы этого типа позволяют изучать растительные клеточные популяции в очень широком диапазоне концентраций биомассы клеток. Вместе с тем стрессовое воздействие перемешивающего устройства на клеточную популяцию часто ограничивает их применение.

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

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

Проточное (непрерывное) культивирование характеризуется постоянным добавлением в биореактор свежей питательной среды и постоянным отбором либо суспензии (*открытое проточное культивирование*), либо отработанной среды (*закрытое проточное культивирование*). Непрерывная культура представляет собой открытую систему, стре-

мящуюся к установлению динамического равновесия. Для организмов создаются неизменные условия среды. Проточное культивирование конструктивно более сложно и поддается автоматическому регулированию, так как связано с введением в схему биореактора дополнительных устройств (перистальтических насосов, разделительных устройств и др.).

В периодической культуре условия все время меняются: плотность культуры возрастает, а концентрация субстрата уменьшается. Однако очень часто требуется, чтобы клетки могли долгое время находиться в фазе экспоненциального роста при постоянной концентрации субстрата в неизменных прочих условиях. Этого можно достичь, если в сосуд, содержащий культуру клеток, непрерывно вводить новый питательный раствор и одновременно удалять из него соответствующее количество клеточной суспензии.

Применение проточных сред при культивировании тканей обеспечивает динамичность и большее постоянство условий их питания. Преимущество проточной питательной среды над непроточными твердой и жидкой средами наблюдалось при выращивании незрелых зародышей. Сложность методического и технического обеспечения проточности питательных сред в процессе выращивания, очевидно, является причиной того, что эти среды еще не нашли широкого применения. Однако моделирование условий питания при проточности питательной среды стоит ближе к нативным условиям. Это преимущество, по-видимому, будет учитываться при дальнейшем совершенствовании условий питания в культуре ткани.

В практике микробиологических исследований широко применяют две разновидности открытого проточного культивирования: хемостатный и турбидостатный методы.

Хемостатный метод культивирования клеток базируется на использовании биореактора, в который с постоянной скоростью подается питательная среда и одновременно с той же скоростью (например, слив по уровню) отбирается клеточная суспензия. При этом объем выращиваемой суспензии остается постоянным. Хемостат состоит из сосуда-культиватора, в который из особого резервуара поступает с постоянной скоростью питательный раствор. Благодаря

аэрации и механическому перемешиванию, в культиваторе создаются оптимальные условия для снабжения клеток кислородом и более быстрого и равномерного распределения питательных веществ, поступающих с новыми порциями раствора. Рост культуры в хемостате контролируется концентрацией субстратов. На таком ограничении скорости роста концентрацией одного из необходимых субстратов основана стабильность системы.

Турбидостатный метод предусматривает измерение концентрации клеточной биомассы в биореакторе и ее автоматическое поддержание на постоянном уровне путем изменения скорости протока. Работа турбидостата основана на поддержании постоянной плотности суспензии, или постоянной мутности. Датчик мутности регулирует через управляющую систему поступление питательного раствора. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, и скорость роста культуры приближается к максимальной. Турбидостат используют при скоростях протока, близких к максимальной удельной скорости роста, тогда как хемостат иногда становится неустойчивым и может произойти полное вымывание культуры из биореактора. Работа с турбидостатами технически сложнее, чем с хемостатами.

Хемостатный метод культивирования позволяет выделять фактор (чаще всего концентрацию ростлимитирующего компонента питательной среды), определяющий физиолого-биохимическое состояние клеточной популяции. Так, было показано, что удельная скорость роста популяции клеток *Acer pseudoplatanus L.* может контролироваться концентрацией нитрата в питательной среде согласно соотношению, определенному Ж. Л. Моно для бактерий.

В то же время в условиях хемостатного выращивания не всегда удается поддерживать в течение продолжительного времени стационарное состояние культур растительных клеток. Например, культура клеток табака, выросшая в условиях хемостата на стандартной питательной среде для периодического выращивания, после одной-двух недель темнела и лизировалась. Только после увеличения концентрации всех компонентов в среде удалось получить (в условиях хемостата) стабильное состояние культуры клеток в течение 73 су-

ток. Следовательно, для поддержания стабильно пролиферирующей культуры необходимо обеспечивать достаточно высокую концентрацию компонентов питательной среды.

Наряду с лимитирующей концентрацией субстрата, на развитие суспензионной культуры растительных клеток, растущей в условиях хемостата, значительное влияние оказывает и скорость протока суспензии. Ее увеличение выше максимальной удельной скорости роста клеток приводит к вымыванию культуры из биореакторов. Поэтому данный метод непригоден для изучения медленно растущих (медленно делящихся) клеточных популяций.

Новые возможности изучения физиолого-биохимического состояния клеточной популяции появляются при использовании «закрытого протока», когда не происходит удаления клеточной биомассы. При этом питательная среда добавляется в биореактор постоянно, и с той же скоростью из него удаляется бесклеточная культуральная жидкость. Данный режим выращивания растительных клеток правильнее было бы называть закрытым по биомассе протоком, однако обычно употребляют термин «закрытый проток», несмотря на его формальную нелогичность.

В заключение отметим преимущества и недостатки периодических и полупериодических процессов ферментации.

Преимущества:

- малая стоимость аппарата и системы управления;
- гибкость, т. е. возможность наработки в одном биореакторе разных продуктов;
- время культивирования можно произвольно менять;
- процесс менее подвержен инфицированию, мутациям клеток вследствие отсутствия протока и притока из-за относительно малого времени ферментации;
- процесс удобен для получения малых количеств продукта;
- условия культивирования можно поддерживать в оптимуме как в фазе роста биомассы, так и в фазе биосинтеза продукта, причем оптимальные условия для биомассы и продукта могут быть различны;
- процесс удобен для реализации биосинтеза вторичных метаболитов.

Недостатки:

- необходимость приготовления посевного материала;
- велико непродуктивное время ферментации;
- в связи с частой стерилизацией быстрее изнашиваются измерительные приборы, особенно датчики величины рН;
- производительность по биомассе и продукту часто ниже, чем при непрерывном процессе.

6.3. Продукты биотехнологии и блок-схемы их производств

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

Продуктами биотехнологического производства могут быть:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10. **Жидкая среда (культуральная жидкость) с экстрагированными (выщелоченными) из твердой фазы компонентами** (например, бактериальное выщелачивание металлов из руд, микробиологическое обессеривание угля и нефти).

Все эти продукты получают по технологическим схемам, или блок-схемам, содержащим несколько стадий. В каждом конкретном случае это определяется целевой задачей, а также свойствами микроорганизмов, сырья и самого готового продукта.

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

Блок-схема *производства биогаза* (рис. 6.3) значительно короче общей типовой схемы и включает подготовительные стадии, стадию метанового брожения и сушку как стадию концентрирования. Компримирование (сжатие) биогаза можно рассматривать как создание его готовой формы.



Рис. 6.3. Блок-схема производства биогаза (по В.В. Бирюкову, 2004)

В *производстве йогурта* (рис. 6.4) предусмотрены две подготовительные стадии, одна биотехнологическая и стадия розлива, представляющая собой приведение продукта к готовой форме.

Процесс *производства хлеба* схематически представлен на рис. 6.5. Приготовление опары (суспензии муки в воде) аналогично приготовлению среды в биотехнологических производствах. В опару добавляют дрожжи для брожения, затем вновь муку (замес теста) и проводят анаэробный биологический процесс брожения. Далее тесто делят на заготовки, и они уже в третий раз подвергаются воздействию дрожжей в процессе *расстойки*. При этом диоксид углерода, образующийся при брожении, увеличивает объем хлеба и создает его пористость. Стадия выпечки закрепляет полученный результат и превращает, по существу, жидкий полупродукт в твердое тело — хлеб и хлебобулочные изделия.

Приведенные примеры показывают, что биотехнологические производства включают в себя как специфические

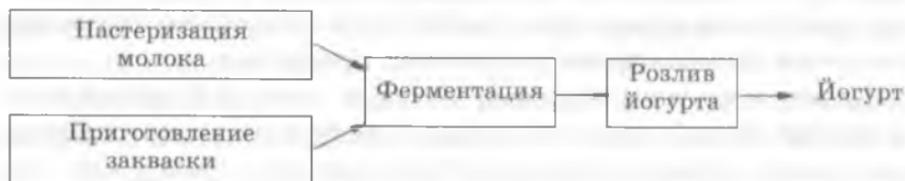


Рис. 6.4. Блок-схема производства йогурта (по В.В. Бирюкову, 2004)

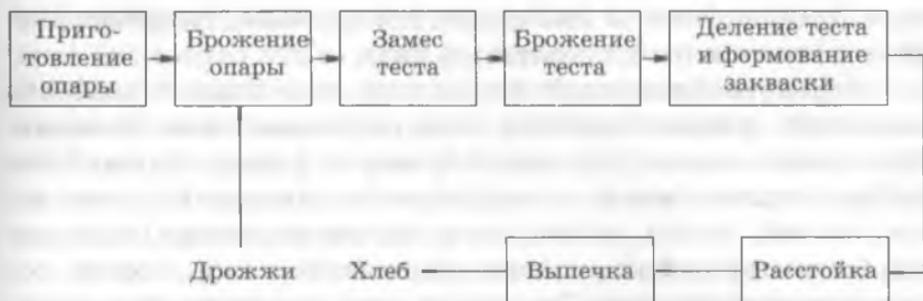


Рис. 6.5. Блок-схема производства хлеба (по В.В. Бирюкову, 2004)

для биотехнологии стадии (ферментация, биоокисление, биотрансформация, брожение, бактериальное выщелачивание, биокомпостирование, ферментолиз, стерилизация среды и воздуха, дезинтеграция микроорганизмов), так и множество стадий, встречающихся в химической технологии (фильтрация, сепарация, отстаивание, экстракция, сушка, выпаривание, ультрафильтрация и обратный осмос, кристаллизация, ректификация, коагуляция и др.). Эти стадии, конечно, имеют свою специфику в биотехнологических производствах в связи с физическими и физико-химическими свойствами биологического объекта, его лабильностью и вариабельностью.

6.4. Белковые продукты

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

Самыми важными веществами всех живых организмов являются белки — азотсодержащие вещества, различные по своему строению и молекулярной массе. В составе белков содержится примерно 16 % азота, а также углерод, водород, кислород и — часто — другие элементы, такие, как

сера, фосфор, железо (молекула гемоглобина, например, содержит четыре атома железа) и медь.

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

Белок животного происхождения — наиболее дефицитный компонент пищи. Мировая потребность в нем в настоящее время удовлетворяется лишь на 40 %. В связи с этим необходим поиск (в том числе и методами промышленной биотехнологии) ресурсов белка для пищевых целей.

Одним из современных способов получения белковых веществ является микробиологический синтез, поскольку по скорости роста микроорганизмы превосходят сельскохозяйственные культуры в сотни, а животных — в тысячи раз. Кроме того, для микробиологического синтеза не требуется больших земельных площадей, он не зависит от погодных и климатических условий и не загрязняет окружающую среду ядохимикатами.

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

В 1960-е гг. появился термин «белок одноклеточных организмов» (обычно употребляют его сокращенное название — аббревиатуру БОО, от single cell protein — SCP), которым обозначают целые неживые высушенные клетки водорос-

лей, дрожжей, бактерий или грибов, используемые в качестве белкового продукта для кормовых и пищевых целей. В отечественной литературе этот белок называют **белково-витаминным концентратом** или **БОО**. Все эти названия несколько условны, так как в биомассах, помимо белков, существенную долю занимают другие компоненты — сахара, липиды, нуклеиновые кислоты.

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

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

Для синтеза белка микроорганизмы способны использовать различные углеродсодержащие субстраты:

- углеводы;
- жидкие углеводороды;
- газообразные углеводороды;
- оксидаты углеводородов;
- углекислый газ, включая смеси с водородом.

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

Максимальные скорости синтеза белковых веществ микробными клетками реализуются при оптимальных услови-

ях среды, когда удельная скорость роста близка к максимальной. Поэтому для получения белка одноклеточных биотехнологические процессы реализуют в проточном режиме, который позволяет стабилизировать практически все параметры стадии ферментации на уровнях, оптимальных для размножения клеток со скоростями роста, близкими к максимальной, т. е. в режиме белковой направленности биосинтеза.

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

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

Микроорганизмы, используемые в пищевой промышленности, часто входят в состав конечного продукта (хотя доля их там обычно невелика). Особенность белка одноклеточных организмов заключается в том, что он практически целиком состоит из микробной биомассы и в его производстве нередко принимают участие микробы, которые ранее в пище отсутствовали. По этой причине к белку одноклеточных организмов предъявляются повышенные требования (в том числе требование биобезопасности) учреждениями, контролирующими качество пищевых продуктов. Поэтому производство БОО направлено преимущественно на выработку кор-

мов для животных, а не белков, непосредственно идущих в пищу. Корма для животных должны содержать некоторое количество белка (до 15–20 % — в зависимости от их вида и способа содержания). Для их производства можно использовать более широкий круг субстратов, в том числе и органические вещества отходов, что экономически выгодно.

К БОО-продуктам, производимым промышленностью на корм животным, относятся прутин (Pruteen) фирмы ICI (биомасса бактерий, выращенных на метаноле), топрина (Toprina) фирмы ВР (дрожжи, выращенные на алканах) и грибная масса, получаемая по технологии фирмы Finnish Pekilo. При ее производстве в качестве субстрата используют сульфитный щелок — отход бумажной промышленности. Все эти БОО представляют собой слабоокрашенные порошки.

Число БОО-продуктов, используемых в пище, немногочисленно. Это дрожжевой экстракт (гидролизат пекарских дрожжей), применяемый в небольшом количестве как вкусовая и витаминная приправа. Во время Второй мировой войны в пищевых целях в Германии выращивали дрожжи *Candida*, но это производство не получило дальнейшего развития. Фирма Hoechst выпускает на основе бактерий, растущих на метаноле, продукт, содержащий 90 % белка. Этот продукт получают при фракционировании клеток выращенных бактерий, он обладает определенными функциональными свойствами и может использоваться в пищу. Единственный новый официально разрешенный вид белковой пищи микробного происхождения — это микопротеин, производство которого налажено в Англии фирмой Ranks Novis Mc Dougal.

Грибной белок *микопротеин* — это пищевой продукт, состоящий в основном из мицелия гриба. Его производят методом непрерывного выращивания выделенного из почвы штамма *Fusarium graminearum*. Субстратом для него являются глюкоза и другие питательные вещества, а источниками азота — аммиак и аммонийные соли. После завершения стадии ферментации культуру подвергают термообработке (для уменьшения содержания рибонуклеиновой кислоты),



Рис. 6.6. Блок-схема производства микопротеина (по И. Хиггинсу и др., 1988)

а затем уже отделяют мицелий методом вакуумного фильтрования (рис. 6.6).

Текстура массы мицелия гриба близка к таковой естественных продуктов и имеет волокнистое строение, поэтому продукту можно придать текстуру мяса, а за счет добавок — мясной вкус и цвет. Для хранения грибной белок обычно замораживают, но иногда и высушивают путем распыления до порошкообразного состояния. Получение микопротеина имеет ряд преимуществ, по сравнению с процессом синтеза белка животными: высокая скорость роста (что характерно для производства всех БОО-продуктов) и более эффективное превращение субстрата в белок.

6.5. Аминокислоты

Аминокислоты являются основными структурными элементами, из которых построены белки и которые определяют многие важные их свойства. Первую аминокислоту — глицин — выделил из желатина в 1820 г. А. Браконно, последнюю — треонин — выделил из гидролизата фибрина в 1935 г. А. Роуз.

Аминокислоты находят широкое применение в качестве кормовых и пищевых добавок, приправ, сырья для фармацевтической и парфюмерной промышленности. При этом из 20 аминокислот, необходимых для построения белка, незаменимыми для человека являются восемь — лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, фенилаланин. Для сельскохозяйственных животных этот список дополняют гистидин и аргинин, а для молодняка птицы — еще и пролин. В связи с этим аминокислоты добавляют в корма, что сокращает расход дефицитных белков животного происхождения.

За последние годы количество аминокислот, используемых в кормопроизводстве, возросло в 15 раз, что составляет около 70 % от объема их производства. Около 30 % производимых аминокислот применяют в пищевой промышленности. Например, цистеин предотвращает пригорание пищи в процессе приготовления, улучшает качество хлеба при выпечке и усиливает запах пищи. Глицин, обладающий освежающим, сладковатым вкусом, используют при производстве напитков. Глутаминовая кислота способствует усилению вкуса и консервированию пищи. Некоторые аминокислоты (аргинин, метионин, цистеин, фенилаланин и др.) используют в медицине. Широко применяют аминокислоты в химической и фармацевтической промышленности в качестве предшественников при производстве детергентов, полиаминокислот, а также полиуретана и препаратов для сельского хозяйства.

Ежегодно в мире производится около 800 тыс. т аминокислот стоимостью свыше 5 млрд долларов. Более половины от общего объема производства приходится на долю L-глутаминовой кислоты, которую используют для получения глутамата натрия (натриевая соль глутаминовой кислоты) — широко известного усилителя вкуса и аромата.

Получение аминокислот возможно путем химического синтеза, гидролиза природного белкового сырья и биотехнологическим способом.

При химическом синтезе образуется продукт *рацемат*, содержащий как L-, так и D-формы аминокислот. D-изомеры этих соединений в большинстве случаев токсичны (за исключением глицина и метионина).

Получение оптически активных L-изомеров аминокислот из гидролизатов природных материалов растительного и животного происхождения связано с многоступенчатой и дорогостоящей очисткой.

Процесс биотехнологического производства аминокислот включает прямую микробную ферментацию, микробиологический или ферментативный синтез из предшественников. В настоящее время наиболее распространен *микробиологический метод*. Он основан на способности микроорганизмов синтезировать все L-аминокислоты, а в определенных условиях — осуществлять их сверхсинтез.

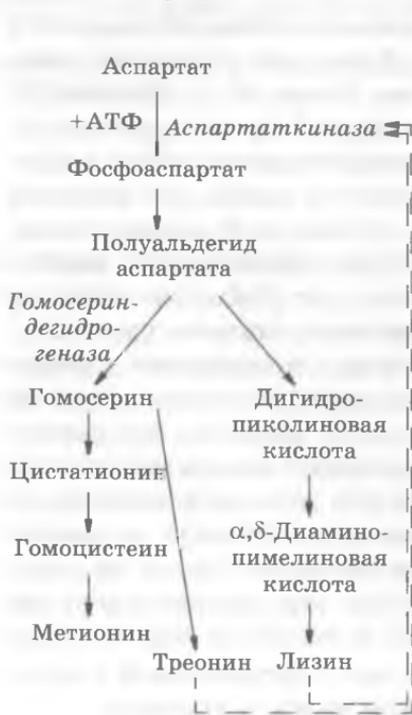


Рис. 6.7. Схема биосинтеза лизина, метионина и треонина в клетках микроорганизмов (по Т.А. Егоровой и др., 2003). Стрелка указывает ингибирование по принципу обратной связи

Образование каждой аминокислоты в микробных клетках строго определено и находится под четким генетическим контролем (рис. 6.7). Он осуществляется по принципу обратной связи на уровне генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов (*репрессия*), и на уровне самих ферментов, которые в результате избытка образующихся аминокислот могут изменять свою активность (*ретроингибирование*). Данный механизм контроля исключает перепроизводство аминокислот, а также препятствует их выделению из клеток в окружающую среду.

Чтобы добиться сверхсинтеза отдельных аминокислот, нужно «обойти» или изменить механизм их синтеза. Для этого можно использовать природные («дикие») штаммы, оптимизировать условия ферментации, можно также добиться дисбаланса в метаболизме ами-

нокислот за счет изменения некоторых факторов среды (концентрации основного субстрата, pH, соотношения макро- и микроэлементов и др.).

В промышленных масштабах аминокислоты получают либо экстракцией из белковых гидролизатов, либо очисткой продуктов метаболизма двух неспорулирующих грамположительных почвенных бактерий, например *Corynebacterium* или *Brevibacterium spp.* Обычно для повышения их продуктивности используют мутагенез с последующим отбором штаммов — сверхпродуцентов определенных аминокислот. Однако такой способ их получения требует много времени, а эффективность его невелика.

Альтернативным подходом является выделение и изменение специфических генов, кодирующих ключевые ферменты определенных биохимических реакций. Таков, например, генно-инженерный способ получения аминокислоты триптофана, синтезируемой *Corynebacterium glutamicum*. Это достигается введением в клетки «дикого» типа копии гена, кодирующего анранилатсинтазу — фермент, лимитирующий синтез триптофана. Высокий уровень биосинтеза триптофана достигается также введением в клетки *C. glutamicum* модифицированных генов трех ключевых ферментов его биосинтеза: 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтазы, анранилатсинтазы и анранилатфосфорибозилтрансферазы. В качестве альтернативы для синтеза аминокислот можно использовать *E. coli*.

Изменение синтеза аминокислот осуществимо генетическими методами, в том числе за счет использования мутантных организмов, таких, как ауксотрофные и регуляторные мутанты. Промышленные штаммы, как правило, несут несколько мутаций, затрагивающих механизмы регуляции целевой аминокислоты и ее предшественников.

Среди продуцентов аминокислот — различные микроорганизмы, представители родов *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Escherichia*. Для получения таких аминокислот, как L-глутамат, L-валин, L-аланин, L-глутамин и L-пролин, возможно применение природных штаммов и усиление у них продукции аминокислот условиями ферментации. Например, высокий выход глутамата (до

30 г/л) возможен при полном или частичном подавлении активности α -кетоглутаратдегидрогеназы, при добавлении в среду ПАВ и антибиотиков (пенициллина, цефалоспорина).

6.6. Гормоны

С давних времен среди людей нормального телосложения рождаются и лилипуты (примерно 10 человек на 1 млн населения). Доказано, что в период, когда тело растет, у лилипутов отсутствует специальный гормон — соматотропный, или гормон роста; такое нарушение физиологии имеется в генотипе этих людей. Но если в период роста в организм вводить этот гормон, то человек, казалось бы обреченный стать лилипутом, будет расти и достигнет нормального роста.

Соматотропный гормон (соматотропин, соматропин) является одним из гормонов передней доли гипофиза. По строению соматотропин является пептидным гормоном, состоит из 121 аминокислотного остатка, его молекулярная масса равна 20 кДа.

Влияние соматотропина на процессы метаболизма. Соматотропин играет существенную роль в постнатальном развитии организма, контролируя многие стороны углеводного, липидного и минерального обмена. Гормоном роста его называют потому, что у детей и подростков, а также у молодых людей с еще не закрывшимися зонами роста в костях он вызывает выраженное ускорение линейного (в длину) роста, в основном за счет длинных трубчатых костей конечностей. Дефицит гормона приводит к карликовости, лечение которой проводится посредством соматотропинотерапии. Секреция соматотропина максимальна у подростков в период интенсивного линейного роста и полового созревания. С возрастом она постепенно понижается и минимальна у пожилых людей.

Соматотропин оказывает мощное анаболическое и антикатаболическое действие, усиливает синтез белка и тормозит его распад, а также способствует снижению отложения подкожного жира, усилению его сгорания и увеличению соотношения мышечной массы к жировой. Кроме того, соматотропин принимает участие в регуляции углеводного обмена: он вызывает выраженное повышение уровня глюкозы в

крови и является одним из гормонов-антагонистов инсулина по действию на углеводный обмен. При гипогликемии уровень соматотропина в крови резко повышается — это один из естественных физиологических механизмов быстрой коррекции гипогликемии.

Соматотропный гормон можно добывать дорогим и неприятным способом — из гипофиза мозга умерших людей.

Использование биотехнологических методов позволило «сконструировать» микроорганизм, способный синтезировать соматотропный гормон, и организовать его производство, которое может удовлетворить все потребности человечества.

Получение соматотропина с использованием генно-инженерных методов проводилось с учетом того, что просоматотропин не подвергается процессингу в бактериальной клетке. Первоначально из клеток гипофиза выделили соответствующую мРНК (рис. 6.8). Фрагмент ДНК, кодирующий первых 23 аминокислотных остатка с N-конца, был получен методом химико-ферментативного синтеза, а олигопептид, кодирующий остальные аминокислотные остатки гормона,

Рис. 6.8. Схема получения гормона роста человека (по А.С. Конищеву и Г.А. Севастьяновой, 2003):

а — выщепление рестриктазной области, кодирующей сигнальный пептид, и присоединение триплета ATG, кодирующего метионин;

б — присоединение к гену промотора и области, необходимой для связывания мРНК с рибосомой *E. coli*, включение в вектор; *в* — экспрессия гена в клетках бактерии



представлял собой кДНК, полученную посредством обратной транскриптазы на матрице мРНК. Затем оба фрагмента объединяли в одной плазмиде и переносили в *E. coli*. Такая трансформация и клонирование этого вектора в бактериальных клетках, где осуществляются интенсивная репликация, транскрипция и трансляция, позволили получить необходимое количество гормона. Он обладал биологической активностью, сопоставимой с гипофизарным соматотропином.

Получение генно-инженерного соматотропина явилось решением проблемы обеспечения медицины этим препаратом. Кроме того, он используется и в практическом животноводстве, повышая интенсивность роста животных.

Соматостатин — это один из гормонов гипоталамуса, а также гормон δ -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. По химическому строению это пептидный гормон, содержащий 14 аминокислот. Соматостатин существует в двух биологически активных формах, происходящих от одного предшественника и различающихся длиной N-конца (рис. 6.9).

Соматостатин подавляет секрецию гипоталамусом соматотропин-рилизинг-гормона и секрецию передней долей гипо-

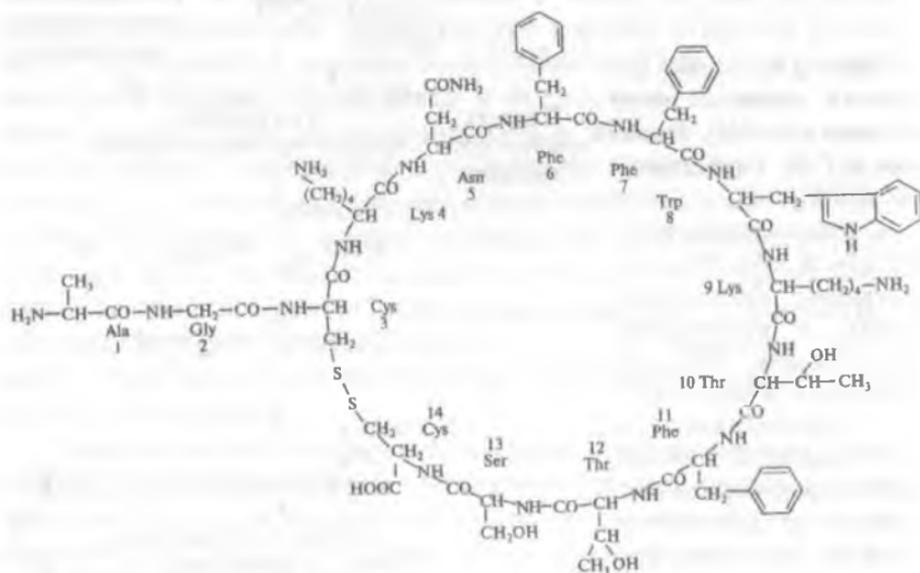


Рис. 6.9. Первичная структура молекулы соматостатина (по Т.А. Егоровой и др., 2003)

физа соматотропного гормона, а также секрецию различных гормонально активных пептидов и серотонина, продуцируемых в желудке, кишечнике, печени и поджелудочной железе. Наиболее распространенное фармакологическое воздействие на соматостатинэргическую систему связано с ингибированием выброса гормона роста, что делает данную систему весьма перспективной при лечении опухолевых заболеваний.

Получение соматостатина с использованием генно-инженерных методов представляет собой интересный пример целенаправленного конструирования белков (рис. 6.10).

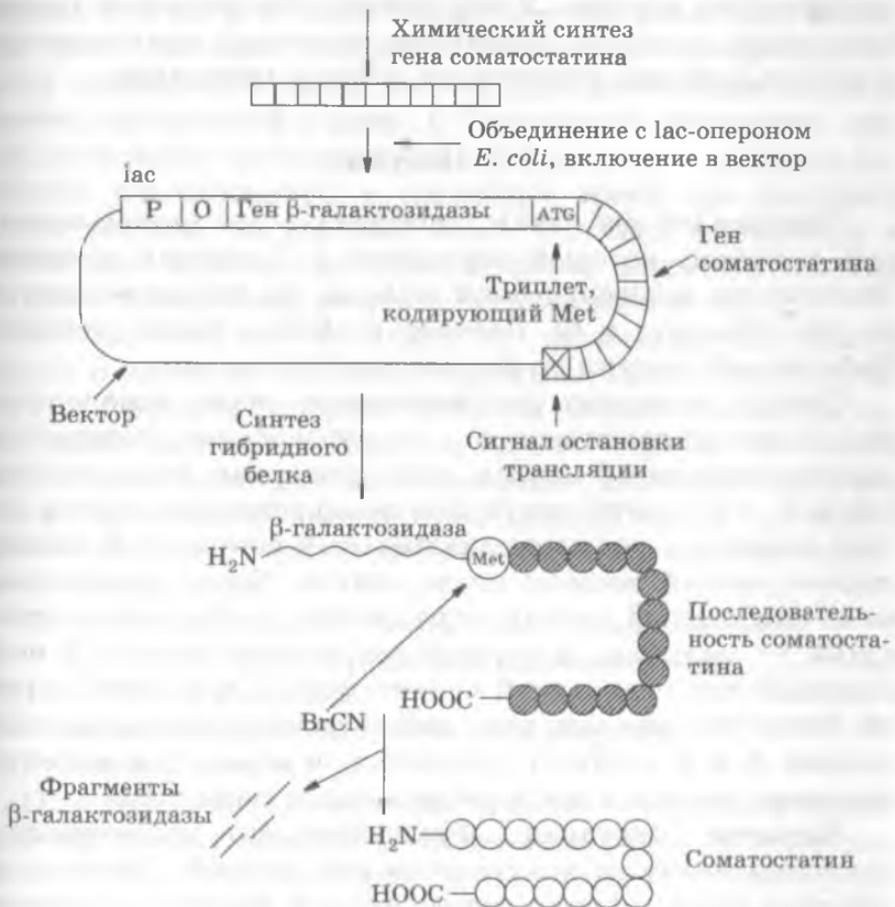


Рис. 6.10. Схема получения соматостатина с использованием генно-инженерных методов (по А.С. Коничеву и Г.А. Севастьяновой, 2003)

Получить соматостатин в клетках бактерий в значительных количествах первое время не удавалось, так как он быстро разрушался протеолитическими ферментами. Чтобы «обмануть» внутриклеточные бактериальные протеазы, пришлось сконструировать химерный белок — искусственный предшественник соматостатина. В этом белке в качестве N-концевого участка использовали легко синтезируемый белок бактерии, а к нему через аминокислоту метионин присоединили сам соматостатин. Все это сделано на уровне генетического материала ДНК, который затем клонировали в соответствующем векторе. Успех работы обеспечивался предварительным анализом первичной структуры соматостатина, в составе которого отсутствуют остатки метионина.

6.7. Инсулин

Инсулин (от лат. *insula* — остров) — это гормон пептидной природы, который образуется в β -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы. За открытие инсулина Дж. Маклауд и Ф. Бантинг в 1923 г. были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине.

Синтез инсулина осуществляется через одноцепочечный белок-предшественник — *препроинсулин*, который содержит сигнальный пептид, аминокислотные последовательности А и В, соответствующие полипептидным цепям зрелого гормона, а также соединительный пептид С. В клетках поджелудочной железы после синтеза белка-предшественника сигнальный пептид отщепляется и образуется *проинсулин* — молекула, в которой сохраняется пептид С, необходимый для правильной ориентации А- и В-цепей гормона. После образования двух дисульфидных мостиков между цепями А и В пептид С удаляется, и образуется молекула инсулина, обладающая гормональными свойствами.

Значение инсулина обусловлено его разнообразным влиянием на обмен практически всех тканей. Основное же действие этого гормона заключается в снижении концентрации глюкозы в крови.

Инсулин увеличивает проницаемость плазматических мембран для глюкозы, активизирует ключевые ферменты

гликолиза, стимулирует образование в печени и мышцах из глюкозы гликогена, усиливает синтез жиров и белков. Кроме того, он подавляет активность ферментов, расщепляющих гликоген и жиры. То есть, помимо анаболического действия, инсулин обладает также и антикатаболическим эффектом.

Нарушение секреции инсулина вследствие деструкции β -клеток (абсолютная недостаточность инсулина) является ключевым звеном патогенеза сахарного диабета 1-го типа. Нарушение действия инсулина на ткани (относительная инсулиновая недостаточность) приводит к развитию сахарного диабета 2-го типа. В связи с этим инсулин выполняет основную роль в лечении диабета — болезни, по распространенности занимающей третье место в мире после сердечно-сосудистых заболеваний и рака. В Российской Федерации, как и во всем мире, количество больных сахарным диабетом постоянно увеличивается; в настоящее время оно достигает 2 млн человек, из которых более 750 тыс. нуждаются в ежедневном приеме инсулина. Мировая потребность в нем составляет несколько десятков килограммов в год.

Обычно инсулин получают из поджелудочных желез свиней и коров, но гормоны этих животных слегка отличаются от инсулина человека: инсулин свиней отличается одной аминокислотой, а инсулин коров — тремя. Отмечено, что инсулин животных часто вызывает побочные эффекты, в том числе аллергическую реакцию на такой препарат. Кроме того, сами возможности выделения и очистки гормона не беспредельны.

Существуют и другие методы получения инсулина:

- биосинтетический, или полусинтетический;
- генно-инженерный;
- модифицированный генно-инженерный;
- синтетический.

При производстве инсулина *полусинтетическим методом* используют природные источники сырья. В этом случае от очищенного инсулина свиньи отщепляют С-концевой октапептид В-цепи. Синтезируют С-концевой октапептид человеческого инсулина и присоединяют его химическим способом. Затем удаляют защитные группы и очищают полученный инсулин.

В настоящее время инсулин человека получают в основном двумя способами. *Первый* связан с модификацией свиного инсулина *синтетико-ферментативным методом*. Он основан на том, что свиной инсулин отличается от инсулина человека одной заменой на С-конце В-цепи Ala30Thr. Замену аланина на треонин осуществляют путем катализируемого ферментом отщепления аланина и присоединения вместо него защищенного по карбоксильной группе остатка треонина, присутствующего в реакционной смеси в большом избытке. После отщепления защитной О-трет-бутильной группы получают инсулин человека.

Второй способ получения инсулина человека — генно-инженерный, т. е. *биотехнологическое получение инсулина*. Оно было осуществлено в 1980-е гг., что имело большое значение для практической медицины. В качестве компетентных клеток использовали *E. coli*, а гены обеих цепей молекулы человеческого инсулина были получены методом химического синтеза. Эти гены присоединяли к 3'-концу гена, кодирующего белок β -галактозидазу, и вводили в векторную плазмиду. Трансформированные клетки *E. coli* синтезировали химерные белки, состоящие из А- или В-цепи инсулина, присоединенные через метионин к β -галактозидазе. С помощью бромцианина, специфически расщепляющего белки по остатку метионина, выделяли индивидуальную цепь инсулина. Однако образование дисульфидных цепей *in vitro* стало лимитирующей стадией всего процесса: выход биологически активного вещества был незначителен (вероятно, в связи с отсутствием С-пептида, без которого плохо проходило образование -S-S-мостиков между А- и В-цепями инсулина).

Поэтому был разработан метод получения проинсулина человека с последующим созреванием его *in tube* (рис. 6.11). Были получены двухцепочечные фрагменты ДНК, соответствующие гену, кодирующему человеческий инсулин. Они были встроены в плазмиду и перенесены в *E. coli*. Полученные рекомбинантные клетки синтезировали проинсулин, который затем *in vitro* превращали в зрелый инсулин.



Рис. 6.11. Получение инсулина человека генно-инженерным методом (по В.П. Комову и В.Н. Шведовой, 2004)

Инсулин стал первым препаратом, созданным с помощью технологии рекомбинантных ДНК. В настоящее время именно такой инсулин широко применяется в медицинской практике.

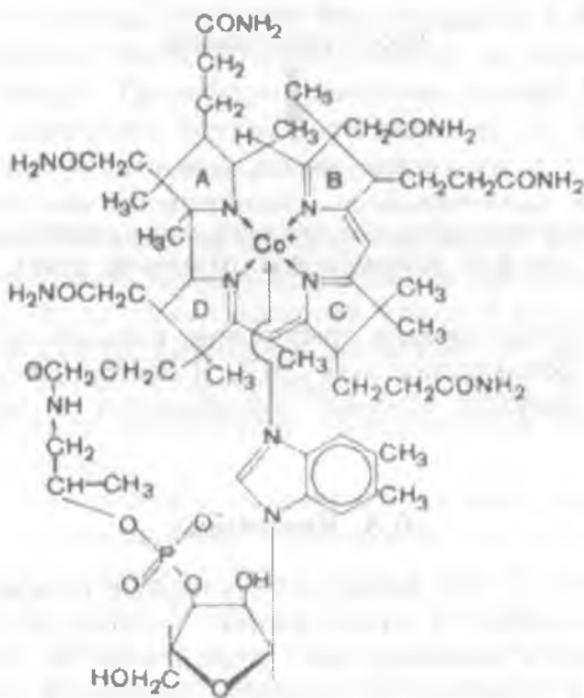
6.8. Витамины

Витамины — это низкомолекулярные органические вещества, способные в очень низких концентрациях оказывать сильное и разнообразное воздействие на живые организмы. Они принимают активное участие в метаболизме человека и высших животных, оказывая влияние на различные физиологические процессы (цикл трикарбоновых

кислот, распад и синтез жирных кислот, синтез аминокислот и др.). Природным источником многих витаминов являются растения и микроорганизмы.

В производстве многих витаминов ведущие позиции занимает химический синтез. Кроме того, для получения отдельных витаминов огромное значение имеет микробный синтез, например при производстве кормовых препаратов витаминов. Микробиологическим путем получают некоторые витамины группы В, а также эргостерин и каротин, являющиеся, соответственно, предшественниками витамина D_2 и провитамина А.

Получение витамина B_{12} . Витамин B_{12} (α -5,6-диметилбензимидазол (ДМБ)-цианокобаламин) необходим для роста и развития многих животных и микроорганизмов (рис. 6.12). Способность к его синтезу широко распространена среди прокариотических микроорганизмов. Активно продуцируют витамин B_{12} *Propionibacterium*, а также *Pseudomonas* и смешанные культуры метанобразующих бактерий.



Витамин B_{12} (кобаламин)

Рис. 6.12. Формула витамина B_{12}

Микробиологический синтез — единственный способ получения витамина B_{12} — осуществляют в две стадии на основе пропионовокислых бактерий, способных к самостоятельному синтезу коэнзима B_{12} (аденозилкобаламина 5,6 ДМБ). Первую стадию культивирования проводят в течение 80 ч в анаэробных условиях и при слабом перемешивании (до полной утилизации сахара). Полученную биомассу центрифугируют и сгущенную суспензию инкубируют во втором аппарате еще в течение 88 ч, аэрируя культуру воздухом ($2 \text{ м}^3/\text{ч}$). Питательная среда содержит сахара (обычно глюкозу, 1–10 %), добавки солей железа, марганца, магния и кобальта (10–100 мг/л), кукурузный экстракт (3–7 %) и азот в виде $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ферментацию проводят при 30°C и pH 6,5–7,0. На второй стадии происходит образование ДМБ. После завершения ферментации витамин извлекают из клеток нагреванием в течение 10–30 мин при $80\text{--}120^\circ\text{C}$. При последующей обработке горячей клеточной суспензии цианидом происходит образование CN-кобаламина. Продукт сорбируют, пропуская раствор через активированный уголь и окислы алюминия, а затем элюируют водным спиртом или хлороформом. После выпаривания растворителя получают кристаллический витамин B_{12} , выход которого достигает 40 мг/л.

Разработаны эффективные технологии получения витамина B_{12} и на основе термофильных бацилл *Bacillus circulans*, которые выращивают в нестерильных условиях в течение 18 ч при $65\text{--}75^\circ\text{C}$ на питательных средах, приготовленных из соевой и рыбной муки, мясного и кукурузного экстракта. Выход витамина составляет от 2,0 до 6,0 мг/л.

Для нужд животноводства витамин B_{12} получают на основе смешанной ассоциации, состоящей из четырех культур — углеводсбраживающих, аммонифицирующих, сульфатовосстанавливающих и собственно метанобразующих бактерий, которые взаимосвязанно расщепляют органический субстрат до CO_2 и CH_4 . В качестве субстрата используют декантированную ацетоно-бутиловую барду, содержащую 2,0–2,5 % сухих веществ. Брожение проходит при $55\text{--}57^\circ\text{C}$ в нестерильной культуре в две фазы: на первой образуются жирные кислоты и метан, на второй — метан, углекислота и витамин B_{12} . Длительность процесса в одном аппарате со-

ставляет 2,5–3,5 суток, в двух (последовательно) — 2–2,5 суток. Концентрация витамина в барде достигает 850 мкг/л. Параллельно в значительных количествах образуется газ (65 % метана и 30 % углекислоты). Барда имеет слабощелочную реакцию. Для стабилизации витамина ее подкисляют соляной или фосфорной кислотой, затем в выпарном аппарате сгущают до 20 % содержания сухих веществ и высушивают в распылительной сушилке. Содержание B_{12} в сухом препарате составляет до 100 мкг/г.

Получение витамина B_2 . Название витамина B_2 — рибофлавин — происходит от сахара рибозы, входящего в состав молекулы витамина в виде многоатомного спирта Д-рибита. Он широко распространен в природе и в значительных количествах синтезируется растениями, дрожжами, грибами, бактериями.

Животные, не синтезирующие этот витамин, должны получать его в составе комбикормов, поскольку при его дефиците в организме нарушаются процессы белкового обмена, замедляется рост. Препараты рибофлавина используют в медицине для лечения ряда заболеваний, а в животноводстве — в качестве добавки в корма. Микроорганизмы синтезируют рибофлавин и две его коферментные формы — ФАД и ФМН.

Продуцентами витамина B_2 являются бактерии (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*), дрожжи (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*), микроскопические (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*) и плесневые (*Aspergillus niger*) грибы.

Промышленное получение рибофлавина осуществляют химическим, микробиологическим и комбинированным синтезом. В последнем случае синтезированная микроорганизмами рибоза химически трансформируется в B_2 .

Для медицинских целей микробиологический рибофлавин получают на основе гриба *Aspergillus*. Для высоких выходов витамина (до 7 г/л) используют усовершенствованные штаммы и оптимизированные среды, содержащие (в %): кукурузный экстракт — 2,25; пептон — 3,5; соевое масло — 4,5 и стимуляторы (пептоны, глицин). Используют активный инокулят, которым засевают стерильную среду. Ферментацию проводят в течение семи суток при 28 °С и хорошей

аэрации. Исходный рН составляет около 7,0, в ходе ферментации в связи с выделением кислот среда подкисляется до рН 4,0–4,5. После использования углеродного субстрата продуцент начинает утилизировать кислоты, рН повышается, и затем начинается образование витамина В₂. При этом кристаллы рибофлавина накапливаются в гифах и вне мицелия. На постферментационной стадии для выделения витамина мицелий нагревают в течение 1 ч при 120 °С.

В ряде стран для получения кормовых препаратов витамина В₂ используют достаточно простой способ, основанный на выращивании микроскопического гриба *Ermothecium ashbyii* в глубинной культуре в течение 80–84 ч при 28–30 °С на среде с глюкозой или мальтозой (2,5 %), источником азота в виде NH₄NO₃ и карбонатом кальция (0,5 %). Выход рибофлавина составляет 1250 мкг/мл. Культуральная жидкость концентрируется в вакуумном испарителе до содержания сухих веществ 30–40 % и высушивается в распылительной сушилке. Товарная форма продукта — порошок с содержанием рибофлавина не менее 10 мг/г и 20 % сырого протеина. В препарате присутствуют также никотиновая кислота и витамины В₁, В₃, В₆ и В₁₂. При использовании штамма *Bacillus subtilis*, полученного генно-инженерным методом, выход рибофлавина составлял 4 г/л за 35 суток ферментации.

Получение эргостерина. Эргостерин (эргоста-5,7,22-триен-3β-ол) является исходным продуктом при производстве витамина D₂ и кормовых препаратов дрожжей, обогащенных этим витамином. Витамин D₂ (эргокальциферол) образуется при облучении ультрафиолетом эргостерина, который в значительных количествах синтезируют бурые водоросли, дрожжи, плесневые грибы. Наиболее активные продуценты эргостерина — *Saccharomyces*, *Rhodotoryla*, *Candida*.

В промышленных масштабах эргостерин образуется при культивировании дрожжей и мицелиальных грибов на средах, содержащих избыток сахаров и недостаток азота, при высокой температуре и хорошей аэрации. Более интенсивно эргостерин образуют дрожжи рода *Candida* на средах с углеводородами. Кристаллический препарат витамина D₂ получают при культивировании плесневых грибов (*Penicillium*, *Aspergillus*).

Для получения кормовых препаратов проводят облучение суспензии или сухих дрожжей (*Candida*). Так, тонкий слой 5% -й суспензии дрожжей облучают ультрафиолетовыми лампами с длиной волны 280–300 нм.

Для получения кристаллического препарата витамина дрожжи или грибной мицелий подвергают кислотному гидролизу при 110 °С. Витамин D₂ экстрагируют спиртом, фильтруют, фильтрат упаривают и несколько раз промывают спиртом. Спиртовой экстракт сгущают до 50% -й концентрации сухих веществ, омыляют щелочью. Образовавшиеся кристаллы витамина очищают перекристаллизацией и сушат в эфире, отгоняя последний. Кристаллический осадок растворяют в масле. Препарат используют в медицинских целях. Эргостерин служит также исходным продуктом для получения ряда стероидных гормонов, пищевых и лекарственных препаратов.

6.9. Интерфероны

Интерфероны представляют собой особую группу белков, которые продуцируются клетками иммунной системы у большинства животных и человека. Впервые они были обнаружены как продукты метаболической активности инфицированных вирусами клеток. Следовательно, интерфероны являются «оружием», с помощью которого возможно противостоять болезнетворным бактериям, паразитам и даже раковым клеткам.

Интерфероны — это низкомолекулярные белки со сходными свойствами, состоящие из 146–166 аминокислотных остатков и выделяемые клетками организма в ответ на вторжение вируса. Общим их свойством является нарушение репликации вирусов, т. е. благодаря интерферонам клетки становятся устойчивыми к вирусной инфекции. За это они и получили свое название, происходящее от английского термина *interfere with* — мешать (вирусам осуществлять синтез своей РНК и белков).

При заражении клеток вирусом он начинает размножаться, и одновременно клетка-хозяин «запускает» синтез

интерферонов. Они выходят из клетки, вступают в контакт с соседними клетками и делают их невосприимчивыми к вирусу. Интерфероны действуют, запуская цепь событий, приводящих к подавлению синтеза вирусных белков и — в некоторых случаях — сборки и выхода вирусных частиц (путем активации олигоаденилатсинтетазы) (рис. 6.13).



Рис. 6.13. Механизм действия интерферонов (по Т.А. Егоровой и др., 2003)

Таким образом, интерфероны не обладают прямым противовирусным действием, но вызывают такие изменения в клетке, которые препятствуют размножению вируса.

Образование интерферонов могут стимулировать не только интактные вирусы, но и различные другие агенты, например некоторые инактивированные вирусы, двухцепочечные РНК, синтетические двухцепочечные олигонуклеотиды и бактериальные эндотоксины.

Биологическая активность интерферонов очень высока: достаточно одной их молекулы, чтобы сделать клетку резистентной к вирусной инфекции.

Основные классы интерферонов. Существует три основных класса интерферонов: альфа-интерферон (α), бета-интерферон (β), гамма-интерферон (γ).

α -Интерфероны являются протеинами, не содержащими простетических групп, а β -интерфероны и γ -интерфероны — гликопротеинами.

Основными клетками — продуцентами интерферонов являются: для α -интерферона — макрофаги (лейкоциты Т и В); для β -интерферона — эпителиальные клетки и фибробласты; γ -интерферон продуцируется Т-лимфоцитами и естественными киллерами (NK-клетками).

Все интерфероны обладают не только антивирусным и противоопухолевым действием, но и, что важнее, свойством активировать, понуждать к действию такие клетки иммунной системы, как макрофаги.

Помимо общих свойств, между различными типами интерферонов есть существенные отличия. Основные функции α -интерферона и β -интерферона связаны с ограничением и подавлением вирусной инфекции. γ -Интерферон является одним из ключевых медиаторов активации Т-звена иммунитета.

Основные эффекты действия интерферонов. Все интерфероны обладают противовирусным, иммуномодулирующим, противоопухолевым и антипролиферативным эффектами.

Противовирусный эффект заключается в индукции у обработанных интерфероном клеток «нечувствительности» к вирусам. В этом случае включаются такие механизмы, как подавление синтеза вирусной РНК и подавление синтеза белков оболочки вируса.

Иммуномодулирующий эффект связан со способностью интерферонов регулировать взаимодействие клеток, участвующих в иммунном ответе. Эта функция осуществляется с помощью регуляции экспрессии на мембранах клеток молекул главного комплекса гистосовместимости I типа или путем непосредственной активации иммунокомпетентных клеток. Все эти факторы усиливают фагоцитарные и цитотоксические реакции в зоне воспалительного очага и способствуют эффективной элиминации инфекционного агента.

Противоопухолевый эффект связан со способностью интерферонов замедлять или подавлять рост культуры клеток и активировать противоопухолевые механизмы иммунной системы.

Все противоопухолевые эффекты интерферонов подразделяют на прямые и непрямые. Прямые эффекты связаны со способностью оказывать непосредственное воздействие на опухолевые клетки, их рост и дифференцировку, а непрямые — с усилением способности иммунокомпетентных клеток обнаруживать и уничтожать атипичные клетки организма.

Антипролиферативный эффект заключается в способности интерферонов проявлять свойства цитостатиков: подавлять рост клеток за счет ингибирования синтеза РНК, протеинов, а также ростовых факторов, стимулирующих пролиферацию клеток.

Помимо общих свойств, интерфероны обладают рядом отличий.

α -Интерферон и β -интерферон больше похожи друг на друга. Их гены локализуются в 9-й хромосоме. Для их выработки индуцирующим сигналом являются вирусы. Эти интерфероны обладают выраженным противовирусным и противоопухолевым действием, но в гораздо меньшей степени проявляют иммуномодулирующие свойства.

γ -Интерферон характеризуется выраженным иммуномодулирующим действием, регулирует иммунный ответ и выраженность воспалительных реакций. Противовирусные и противоопухолевые его свойства выражены слабее, чем у α -интерферона и β -интерферона. Тем не менее γ -интерферон существенно усиливает активность α -интерферона и β -интерферона. Ген γ -интерферона расположен в 12-й хромосоме.

Получение интерферонов. Интерфероны служат одним из самых эффективных средств лечения вирусных инфекций, но они видоспецифичны и могут быть получены только из клеток человека. Технология выделения и очистки интерферонов малоэффективна, прежде всего из-за крайне малого выхода конечного продукта. Поэтому получение генно-инженерного продукта является перспективной альтернативой традиционным методам выделения интерферонов.

Ген α -интерферона получили химико-ферментативным методом. Одной из трудностей, которую пришлось преодолеть, было то, что интерферон синтезируется в виде предшественника с дополнительной (сигнальной) последовательностью аминокислотных остатков. Бактериальные клетки не имеют протеиназ, превращающих предшественники в зрелые белки, поэтому надо было синтезировать ген, кодирующий только зрелый интерферон. Такой ген был получен и введен в клетку *E. coli*. Физико-химические свойства α -интерферона, выделенного из бактерий, оказались близки к свойствам интерферона, выделенного из крови доноров.

Значительным событием явилась удачная попытка введения генов интерферонов в дрожжевые клетки. Замена бактериальной клетки в качестве реципиента на дрожжевую сыграла огромную роль для всей генно-инженерной техники вообще и для получения интерферонов в частности. Дело в том, что β -интерферон и γ -интерферон представляют собой гликозилированные белки, а процесс гликозилирования невозможен в *E. coli*, но вполне осуществим в дрожжевой клетке для точного воспроизведения структуры β -интерферона и γ -интерферона. Рекомбинантные штаммы дрожжей синтезировали в больших количествах интерфероны, обладающие выраженной биологической активностью.

Применение интерферонов. Разработка методов получения лейкоцитарного и рекомбинантного интерферонов в препаративных количествах, а также высокоэффективных методов их очистки открыла возможность применения этих препаратов для лечения вирусных и онкологических заболеваний.

Интерфероны представляют высокую ценность при лечении целого ряда заболеваний: вирусного и хронического гепатитов, герпетической инфекции, острых респираторных

заболеваний, рассеянного склероза, миеломы, остеосаркомы. Есть данные о положительном эффекте применения интерферонов для лечения рака легких, мочевого пузыря, яичников, мозга и гортани.

Интерфероны выпускают в качестве лекарственных препаратов в виде капель в нос, мазей или растворов для инъекций. Существуют натуральные интерфероны, полученные из лимфоцитов донорской крови, и искусственно синтезированные с применением генно-инженерных технологий (рекомбинантные). В настоящее время как у нас в стране, так и за рубежом выпускают коммерческие препараты — человеческий лейкоцитарный, лимфобластный (Велферон, Wellferon) и фибробластный (Ферон), а также интерфероны, полученные генно-инженерными методами: рекомбинантные α -интерферон (Роферон, Реальдерон и др.), β -интерферон и γ -интерферон (Гаммаферон).

6.10. Вакцины

Одно из важных направлений биотехнологии — создание и разработка вакцин, способствующих развитию иммунитета к патогенным вирусам и микроорганизмам.

Формированию у реципиента иммунитета к патогенным микроорганизмам способствует вакцинация. Эффект вакцинации был открыт более 200 лет назад, в 1796 г., врачом Э. Дженнером, доказавшим, что человек, перенесший коровью оспу (не очень тяжелую болезнь крупного рогатого скота), становится невосприимчив к оспе натуральной — очень опасному инфекционному заболеванию, с высокой смертностью. Даже если больной не погибает, у него нередко возникают различные уродства, психические расстройства и слепота.

Э. Дженнер публично провел прививку коровьей оспы восьмилетнему мальчику Джеймсу Фиппсу, использовав для этого экссудат из пустулы больной оспой коровы, а затем, через определенное время, дважды инфицировал ребенка гноем из пустулы больного натуральной оспой. Все проявления заболевания ограничились покраснением в месте прививки, исчезнувшим через несколько дней. Это связано с

тем, что в ответ на введение вакцины организм запускает иммунный ответ — вырабатываются антитела, которые при последующей инфекции блокируют пролиферацию патогенного микроорганизма и не позволяют развиваться заболеваемости.

Начиная с первой вакцины, созданной Э. Дженнером, ведутся большие научные исследования в этом направлении. Большинство человеческих противовирусных вакцин создано на основе убитых (инактивированных) патогенных микроорганизмов или живых, но не вирулентных (аттенуированных) штаммов. Такой подход достаточно эффективен и предотвращает распространение многих вирусных инфекций, однако его применение имеет ряд ограничений, связанных с:

- невозможностью культивирования всех патогенных микроорганизмов;

- потенциальной опасностью при работе с патогенными микроорганизмами и вирусами;

- возможностью ревертировать (возвращаться к исходному вирулентному штамму) аттенуированные штаммы (инактивация часто бывает неполной);

- высокой стоимостью производства традиционных вакцин (титр вирусов животных и человека в культуре и скорость их размножения, как правило, невысоки).

В последние годы все большее значение в получении вакцин приобретают биотехнологические подходы, в том числе технология рекомбинантных ДНК. Она позволяет создавать новые препараты, более безопасные и эффективные, менее дорогие и не имеющие ограничений в применении. Для этих целей используют следующие подходы:

1. Патогенный микроорганизм модифицируют, делетируя (убирая) гены, ответственные за вирулентность, при этом сохраняется способность штамма вызывать иммунный ответ. Получают живые вакцины, содержащие непатогенные микроорганизмы, которые не могут ревертировать и становиться патогенными.

2. Гены или их сегменты, кодирующие основные антигенные детерминанты (белки) патогенных микроорганизмов, экспрессируют в альтернативном хозяине, например

E. coli. Получают нужный продукт в большом количестве и используют его как вакцину. Такие вакцины, содержащие лишь отдельные компоненты патогенного микроорганизма, называют субъединичными вакцинами.

Достоинства субъединичных вакцин состоят в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен. Его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могут быть причиной нежелательных побочных эффектов в организме-хозяине.

Недостатками субъединичных вакцин являются высокая стоимость очистки специфического белка и изменение его конформации после выделения, что может повлечь и изменение его антигенных свойств.

Клонированные гены, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенного организма, встраивают в геном непатогенного носителя (обычно вируса) и получают живую безопасную вакцину, которая не содержит болезнетворных микроорганизмов. Живые вакцины, как правило, более эффективны, чем неживые или субъединичные.

В числе новых направлений создания рекомбинантных вакцин — разработка *ДНК-вакцин* (так называемых *генных, полинуклеотидных вакцин, вакцин из нуклеиновых кислот*). Принцип применения ДНК-вакцин заключается в том, что в организм пациента вводят молекулу ДНК, содержащую гены, кодирующие иммуногенные белки патогенного организма и генетические элементы, которые необходимы для экспрессии этого гена в клетках эукариот (человека). В качестве продуцентов таких генов используют бактериальные клетки, содержащие рекомбинантные плазмиды с соответствующими генами. После получения достаточной биомассы (количества копий) плазмидную ДНК выделяют из бактерий, очищают от других молекул ДНК и примесей. Полученную ДНК-вакцину вводят парентерально, при этом большая ее часть поступает в межклеточное пространство, после чего включается в клетки.

Противогерпетические вакцины. Вирус простого герпеса (HSV — *Herpes simplex virus*) вызывает инфекционное заболевание генерализованного или местного характера

(преимущественно поражение кожи, глаз, слизистых оболочек, нервной системы, энцефалит и т. д.). Кроме того, он является онкогенным, поэтому вакцинация убитым или аттенуированным вирусом сопряжена с определенным риском развития рака. Для защиты от HSV-инфекции применяют неонкогенетическую субъединичную вакцину.

Для создания любой субъединичной вакцины прежде всего идентифицируют те компоненты патогенного микроорганизма, которые индуцируют выработку антител. В случае HSV-типа таким компонентом является гликопротеин Д-оболочки (gD). В ответ на введение этого гликопротеина мышам у них вырабатываются антитела, нейтрализующие интактный HSV. Ген *gD* HSV-1 был изолирован, клонирован в одном из экспрессирующих векторов в клетках млекопитающих и введен в яйцеклетки китайского хомячка, в которых, в отличие от *E. coli*, происходит гликолизирование чужеродных белков. Полноразмерный ген *gD* кодирует белок, в норме связывающийся с мембраной клетки млекопитающего. Затем модифицированным геном трансформировали яйцеклетки китайского хомячка, которые гликозилировали белковый продукт и секретировали его во внешнюю среду, так как он не мог встраиваться в клеточную мембрану. Антитела, вырабатываемые в ответ на введение модифицированного белка *gD*, эффективны в отношении вируса простого герпеса.

Противосальмонеллезные вакцины. Разные штаммы *Salmonella* вызывают острые кишечные инфекции, постнатальную (послеродовую) инфекцию, брюшной тиф, пищевую токсикоинфекцию. Для профилактики всех этих заболеваний у овец, цыплят и человека эффективные пероральные вакцины созданы методом двойной делеции.

Такой способ получения непатогенных штаммов, пригодных для создания на их основе живых вакцин, состоит в удалении из генома патогенных бактерий участков хромосом, отвечающих за независимые жизненно важные функции. Лучше делетировать, по крайней мере, две такие области, так как вероятность их одновременного восстановления очень мала. Штамм с двойной делецией обладает ограниченной пролиферативной способностью и сниженной

патогенностью, но обеспечивает выработку иммунного ответа. Штаммы *Salmonella* с двойной делецией вызывают легкую форму инфекции и обладают в 100 тыс. раз меньшей вирулентностью.

6.11. Антибиотики

Антибиотики (от *anti* — против, *bios* — жизнь) — самый большой класс фармацевтических соединений природного или полусинтетического происхождения, которые подавляют рост живых клеток, чаще всего прокариотических или простейших. К этому же классу относятся противогрибковые агенты, противоопухолевые лекарства и алкалоиды.

Современное определение термина «антибиотик» дано в 1961 г. М.М. Шемякиным и А.С. Хохловым, которые предложили считать антибиотическими веществами все продукты обмена любых организмов, способные избирательно убивать или подавлять рост и развитие микроорганизмов.

Антибиотики не просто вещества, действующие против болезнетворных микроорганизмов; это еще и вещества, получаемые с помощью микроорганизмов-продуцентов. Чаще всего они синтезируются актиномицетами, реже — бактериями. Среди актиномицетов наибольший вклад вносит род *Streptomyces* (в частности, только один вид *Streptomyces griseus* синтезирует более 50 антибиотиков).

Наиболее распространенными с коммерческой точки зрения антибиотиками оказались пенициллины, цефалоспорины и тетрациклины.

Пенициллин, исторически первый антибиотик, впервые выделил английский ученый А. Флеминг из плесневых грибов *Penicillium notatum*. В 1928 г. он обнаружил, что на агаре в одной из чашек Петри с бактериями *Staphylococcus aureus* выросла колония плесневых грибов. Колонии бактерий вокруг них стали прозрачными из-за разрушения клеток. Флемингу удалось выделить активное вещество — пенициллин, которое разрушало бактериальные клетки. Эта работа была опубликована в 1929 г. Флеминг недооценил свое открытие, считая, что получить лекарство будет очень

трудно. Работу Флеминга продолжили Г. Флори и Э. Чейн, предложившие методы очистки пенициллина. Его массовое производство было налажено во время Второй мировой войны. В 1945 г. А. Флеминг, Г. Флори и Э. Чейн были удостоены Нобелевской премии в области физиологии и медицины.

Эффект от применения пенициллина превзошел все ожидания. По некоторым данным, только в 1940–1950-е гг. с его помощью было спасено от смерти более 15 млн человек. Действительно, часто раненый погибает не от самой раны, а от гнойного воспаления. Так, рана, полученная А.С. Пушкиным на дуэли, сама по себе не была опасна, но развилось воспаление — перитонит, что и привело к смертельному исходу. При нынешнем состоянии медицины Пушкина можно было бы вылечить с помощью антибиотиков.

Сразу же после открытия пенициллина начались поиски и других антибиотиков. Сейчас их существует уже более 3 тыс., но многие ученые в разных странах мира все время ищут более продуктивные микроорганизмы для их биосинтеза, достигая при этом поразительных успехов. Например, плесень Флеминга в военные годы давала активность по пенициллину не более 10 ед/мл. Современные штаммы микроорганизмов дают 50 тыс. ед/мл того же пенициллина.

Интересно, что в США в послевоенные годы поисками микроорганизмов занимались не только ученые. Институты давали объявления в газеты с просьбой приносить им разные образцы плесеней за вознаграждение. Рассказывают, что в одном из городов этим занималась некая пожилая женщина по имени Мэри. Она по всему городу искала плесень в гнилых фруктах, овощах, испорченном хлебе. Ей даже дали прозвище Заплесневелая Мэри. Так вот, именно она нашла родоначальника современных высокоактивных штаммов биосинтеза пенициллина в заплесневевшей гнилой дыне. Этот микроорганизм был назван *Penicillum chrysogenum*.

По оценкам ВОЗ, каждый год ученые обнаруживают от 100 до 200 новых антибиотиков, прежде всего в рамках обширных исследовательских программ по поиску среди ты-

еяч различных микроорганизмов таких, которые синтезировали бы уникальные антибиотики. Получение, лабораторные и клинические испытания новых лекарственных средств обходятся дорого, поэтому до применения доходят только те из них, которые имеют большую терапевтическую ценность и представляют экономический интерес. Это всего лишь 1–2 % от всех обнаруживаемых антибиотиков.

Обычно антибиотик действует не на все микроорганизмы подряд, да это и нежелательно: ведь наряду с болезнетворными будут уничтожаться полезные микробы, которые всегда есть в человеческом организме. Поэтому должен быть набор различных антибиотиков, пригодных для лечения разных болезней.

Но есть и другая сторона: болезнетворные микроорганизмы постепенно «привыкают» к действию антибиотиков. Возникают виды, которые вызывают заболевание, но они нечувствительны к «старому» антибиотику. Такое привыкание происходит не быстро, а в течение 10–15 лет. Но раз это все-таки происходит, ученым необходимо искать все новые и новые антибиотики и продуцирующие их микроорганизмы.

Образование антибиотиков — это наследственно закрепленная особенность метаболизма микроорганизмов, проявляющаяся в том, что каждый вид (или даже штамм) способен продуцировать один или несколько строго специфичных для него антибиотических веществ, что является результатом эволюции данного микроорганизма.

Специфичность действия антибиотиков объясняется:

— их высокой биологической активностью в отношении чувствительных к ним организмов, т. е. способностью проявлять эффект даже в очень низких концентрациях;

— избирательностью действия, т. е. способностью конкретного антибиотика проявлять свое действие лишь в отношении определенных организмов или групп организмов, не оказывая заметного эффекта на другие формы живых существ.

Величину биологической активности антибиотиков выражают в условных единицах, содержащихся в 1 мл (ед./мл)

или в 1 мг (ед/мг) препарата. За единицу антибиотической активности принято минимальное количество антибиотика, способное подавить развитие или задержать рост определенного числа клеток стандартного штамма тест-микроба в единице объема питательной среды. Так, за единицу активности пенициллина принято минимальное количество препарата, способное задерживать рост золотистого стафилококка (штамм 209) в 50 мл питательного бульона; для стрептомицина единица активности — минимальное количество антибиотика, задерживающее рост *E. coli* в 1 мл питательного бульона.

Синтез микроорганизмами антибиотиков — одна из форм проявления *антагонизма*, который связан с определенным характером обмена веществ, возникшим и закрепленным в ходе эволюции. Воздействуя на постороннюю микробную клетку, это соединение вызывает нарушения в ее развитии. Антибиотики способны подавлять синтез оболочки бактериальной клетки в период размножения, изменять проницаемость цитоплазматической мембраны или ингибировать реакции обмена веществ.

Классификация антибиотиков может быть осуществлена:

— по принципу их биологического происхождения (предпочтительна для биологов, изучающих организмы-продуценты антибиотических веществ);

— по химическому строению (удобна для химиков, занимающихся изучением строения молекул антибиотиков и путей их синтеза);

— по типу и механизму биологического действия (принята в медицинской практике). В этом случае тип действия антибиотиков бывает *«цидным»* (бактерицидным, фунгицидным, вирицидным, протозоацидным), под которым понимают необратимое нарушение жизнедеятельности (гибель) инфекционного агента, и *статическим* (бактериостатическим, фунгистатическим, виристатическим, протозоостатическим), при котором прекращается или приостанавливается размножение возбудителя. Такая градация имеет основное практическое значение при лечении тяжелых инфекций, особенно у пациентов с нарушениями иммунитета, когда обязательно назначение «цидных» препаратов.

В зависимости от места приложения и механизма биологического действия, *антибиотики подразделяют на:*

- специфические ингибиторы биосинтеза клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины, цефамицины и др.);
- препараты, нарушающие молекулярную организацию и функции клеточных мембран (полимиксины, полиены);
- препараты, подавляющие синтез белка на уровне рибосом (макролиды, тетрациклины, левомицетин, фузидин);
- ингибиторы синтеза РНК на уровне РНК-полимеразы и ингибиторы, действующие на метаболизм фолиевой кислоты (рифампицины);
- ингибиторы синтеза РНК на уровне ДНК-матрицы (актиномицины и др.);
- ингибиторы синтеза ДНК на уровне ДНК-матрицы (антрациклины, митомицин С, нитрофураны, налидиксовая кислота).

При выделенном возбудителе назначают антибиотики с максимально узким спектром активности, так как «избыточная» широта спектра не дает преимуществ и опасна с точки зрения подавления нормальной микрофлоры.

В настоящее время установлена полная химическая структура только для трети антибиотиков, продуцируемых микроорганизмами, а химическим путем может быть получена лишь половина из них. В связи с возросшей сложностью выделения эффективных антибиотиков и распространением устойчивости к наиболее широко применяемым соединениям у большого числа патогенных бактерий существует потребность в новых соединениях. Для этого исследователи перешли от поиска новых антибиотиков к модификации структуры уже имеющихся. Они стремятся повысить эффективность антибиотиков, найти защиту от инактивации ферментами устойчивых бактерий и улучшить фармакологические свойства препаратов. В некоторых случаях природные микробные антибиотические продукты химическим или энзиматическим путем могут быть превращены в так называемые полусинтетические антибиотики, обладающие более высокими терапевтическими свойствами.

Современное промышленное получение антибиотиков — это сложная многоступенчатая биотехнологическая схема, состоящая из ряда последовательных стадий (рис. 6.14):

1) стадия биосинтеза (образования) антибиотика — основная биологическая стадия процесса получения антибиотика. Необходимо создание оптимальных условий для развития продуцента и максимально возможного биосинтеза антибиотика;

2) стадия предварительной обработки культуральной жидкости, клеток (мицелия) микроорганизма и фильтрации (отделение культуральной жидкости от биомассы продуцента). Определяется составом среды, характером роста продуцента, местом накопления биологически активного соединения (в культуральной жидкости или внутриклеточно);

3) стадия выделения и очистки антибиотика. В качестве основных методов применяют экстракцию, осаждение, сорбцию на ионообменных материалах, упаривание, сушку;

4) стадия получения готовой продукции, изготовления лекарственных форм, расфасовки.

Для максимального выхода антибиотика при культивировании продуцента необходим комплекс мер, включающий подбор питательных сред, высокопродуктивных штаммов микроорганизмов и режимов их культивирования.

Микроорганизмы, производящие различные метаболиты, в том числе и антибиотики, вначале проходят стадию быстрого роста (тропофазу), во время которой синтез этих веществ незначителен. По мере замедления роста из-за истощения одного или нескольких необходимых питательных веществ в культуральной среде микроорганизм переходит в идиофазу; именно в этот период синтезируются идиолиты.

Эти особенности культурального роста необходимо учитывать в производственном процессе. Например, в случае антибиотиков большинство микроорганизмов в стадии тропофазы чувствительны к собственным антибиотикам, а во время идиофазы становятся устойчивыми к ним. Чтобы уберечь микроорганизмы, продуцирующие антибиотики, от самоуничтожения, важно быстро достичь идиофазы и затем культивировать микроорганизмы в этой фазе. Это достигается

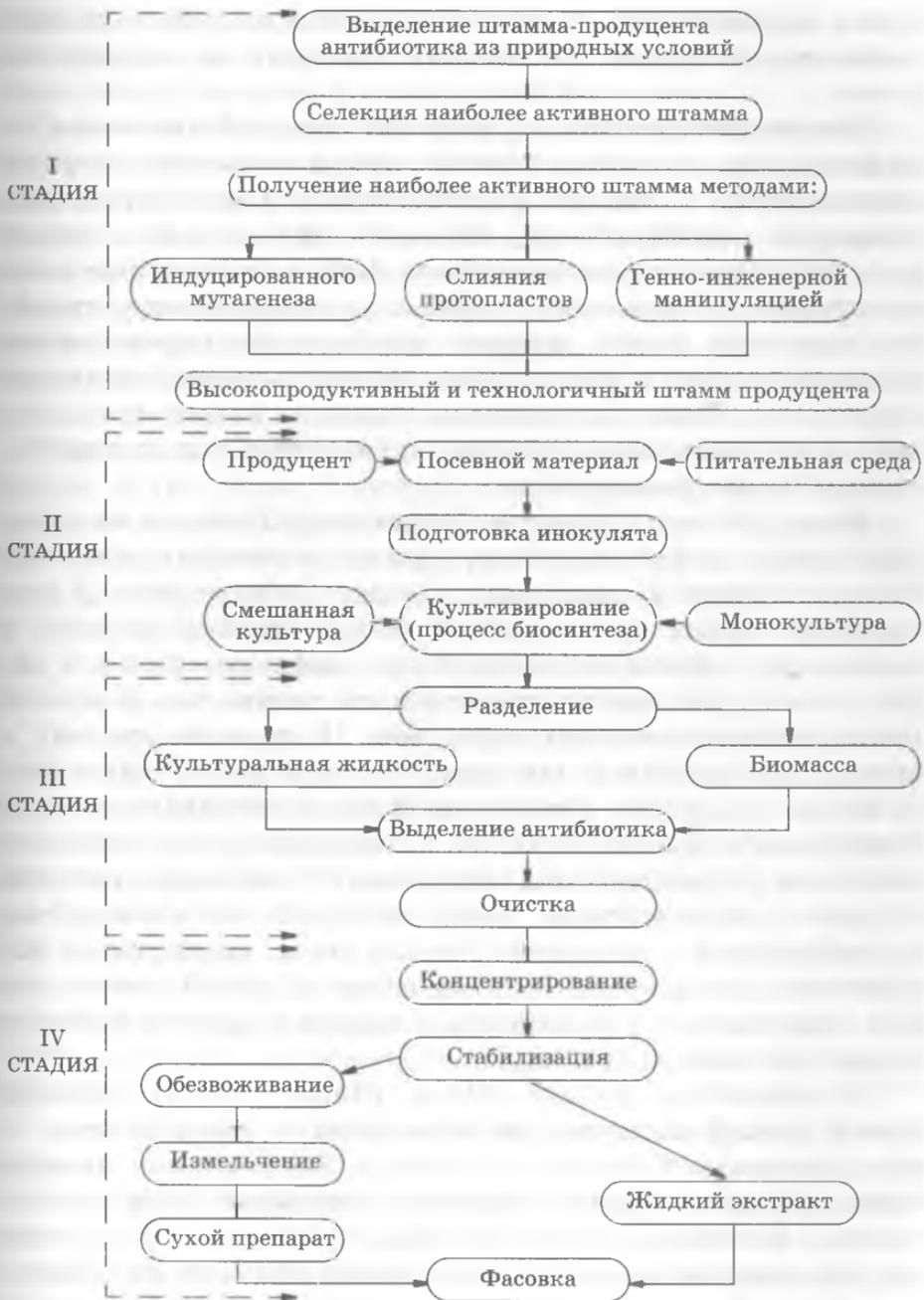


Рис. 6.14. Схема производства антибиотиков в процессе микробного биосинтеза (по Н.С. Егорову, 1994)

путем варьирования режимов культивирования и состава питательной среды на стадиях быстрого и медленного роста.

Новые антибиотики с уникальными свойствами и специфичностью можно получить путем генно-инженерных манипуляций с генами, участвующими в биосинтезе уже известных антибиотиков. Большой эффект здесь может дать технология рекомбинантных ДНК: с ее помощью можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие более мощное действие на определенные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами. Генно-инженерные подходы можно использовать для увеличения выхода антибиотиков и снижения стоимости их производства.

Большинство исследований было сосредоточено на пенициллинах и цефалоспори́нах, структура которых включает четырехчленное β -лакта́мное кольцо. Добавление к β -лакта́мному кольцу метоксильной (CH_3O)-группы привело к появлению цефамицинов, близких к цефалоспори́нам и эффективных как против грамотрицательных, так и против пенициллиноустойчивых микробов. Полусинтез состоит в замене химическим путем одной боковой цепи β -лакта́много кольца на другую в полученной ферментацией молекуле. Устойчивость к пенициллинам и цефалоспори́нам связана с наличием ферментов, так называемых β -лакта́маз, которые широко распространены среди бактерий, актиномицетов, цианобактерий и дрожжей. Так как гены, кодирующие эти ферменты, находятся в составе плазмид, устойчивость может передаваться при переносе плазмид от одного бактериального штамма к другому.

Исследователи фирмы «Мерк, Шарп и Доум» открыли новый класс β -лакта́мных антибиотиков — тиенамицины, — продуцируемые *Streptomyces cattleya*. Тиенамицины чрезвычайно эффективны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также способны ингибировать β -лакта́мазы, что значительно повышает возможности этих антибиотиков. К ингибиторам β -лакта́маз относятся также клавулановая и оливановая кислоты, идентифицированные исследователями английской фармацевтической компании «Бичем». Ком-

пания выпустила новый антибиотик — аугментин, — который представляет собой комбинацию β -лактамного антибиотика амоксициллина и клавулановой кислоты.

Синтез антибиотика является результатом действия 10–30 генов, поэтому практически невозможно обнаружить отдельные спонтанные мутации, которые могли бы повысить его выход. В промышленных штаммах *Penicillium chrysogenum* или *Streptomyces auerofaciens* выход пенициллина или тетрациклина удалось повысить с нескольких миллиграммов на литр (штамм дикого типа) до 20 г/л и более. Эти высокопродуктивные штаммы были получены в результате последовательных циклов мутагенеза и селекции.

В результате мутаций появились новые вторичные метаболиты, в том числе 6-диметилхлортетрациклин и 6-диметилтетрациклин. Определенные мутанты, так называемые идиотрофы, способны синтезировать только половину молекулы антибиотика, а среда должна быть обогащена другой ее половиной. Такая форма мутационного биосинтеза привела к открытию новых производных антибиотиков, в том числе принадлежащих к аминоциклитольной группе.

Создание новых и совершенствование существующих технологий получения антибиотиков, разработка экологически чистых безотходных технологий получения высококачественных препаратов — важнейшая задача современной биотехнологии. В основном антибиотики применяют для борьбы с болезнями человека, животных и растений, как стимуляторы роста животных, при консервировании продуктов, в научных исследованиях (в биохимии, молекулярной биологии, генетике, онкологии).

Традиционно антибактериальные препараты подразделяют на:

- природные (собственно антибиотики, например пенициллин);
- полусинтетические (продукты модификации природных молекул, например амоксициллин, цефазолин);
- синтетические (например, сульфаниламиды, нитрофураны).

Антибиотики используют для предотвращения и лечения воспалительных процессов, вызванных бактериальной

микрофлорой. Они избирательно угнетают жизнедеятельность микроорганизмов. Под избирательным действием понимают активность только в отношении определенных родов и видов микроорганизмов при сохранении жизнеспособности клеток хозяина.

Антибиотики представляют собой самую многочисленную группу лекарственных средств. Так, в России в настоящее время используется 30 различных групп антибиотиков, а число препаратов приближается к 200. Ежегодно во всем мире производится 100 тыс. т антибиотиков на сумму примерно 5 млрд долларов, причем более 100 млрд долларов приходится на долю антибиотиков, добавляемых в корм скоту в качестве добавок или ускорителей роста.

Все антибиотики, несмотря на различия химической структуры и механизма действия, объединяет ряд уникальных качеств.

Во-первых, уникальность антибиотиков заключается в том, что, в отличие от большинства других лекарственных средств, их мишень-рецептор находится не в тканях человека, а в клетке микроорганизма.

Во-вторых, активность антибиотиков не является постоянной, а снижается со временем, что обусловлено формированием лекарственной устойчивости (резистентности). Антибиотикорезистентность — неизбежное биологическое явление, и предотвратить ее практически невозможно.

В-третьих, антибиотикорезистентные микроорганизмы представляют опасность не только для пациента, у которого они были выделены, но и для многих других людей, даже разделенных временем и пространством. Поэтому борьба с антибиотикорезистентностью в настоящее время приобрела глобальные масштабы.

В течение многих лет антибиотики используют как стимуляторы роста сельскохозяйственных животных и птиц, как средство борьбы с заболеваниями растений и посторонней микрофлорой в ряде бродильных производств, как консерванты пищевых продуктов. Механизм стимулирующего действия антибиотиков также не до конца выяснен. Предполагают, что стимулирующий эффект низких concentra-

ций антибиотиков на организм животного связан с двумя факторами:

- воздействием на микрофлору кишечника;
- непосредственным влиянием на организм животного.

В первом случае антибиотики снижают число вредных и увеличивают количество полезных для организма микроорганизмов, во втором — снижают рН содержимого кишечника, уменьшают поверхностное натяжение клеток организма, что способствует ускорению их деления. Кроме того, антибиотики увеличивают количество ростовых гормонов, улучшают приспособляемость организма к неблагоприятным условиям и т. д.

Кормовые антибиотики применяют в виде неочищенных препаратов, представляющих собой высушенную массу продукта, содержащую, помимо антибиотика, аминокислоты, ферменты, витамины группы В и другие биологически активные вещества. Все производимые кормовые антибиотики:

- не используются в терапевтических целях и не вызывают перекрестной резистентности бактерий к антибиотикам, применяемым в медицине;
- практически не всасываются в кровь из пищеварительного тракта;
- не меняют своей структуры в организме;
- не обладают антигенной природой, способствующей возникновению аллергии.

В настоящее время производится несколько видов кормовых антибиотиков: препараты на основе хлортетрациклина (биовит, кормовой биомицин), бацитрацин, гризин, гигромицин В и др. Из этих препаратов только бацитрацин представляет собой высушенную культуральную жидкость, полученную в результате глубинного выращивания *Bacillus licheniformis*. Остальные антибиотики являются продуктами жизнедеятельности разных видов *Actinomyces*.

Антибиотики используют и как средство борьбы с различными фитопатогенами. Действие антибиотика сводится к замедлению роста и гибели фитопатогенных микроорганизмов, содержащихся в семенах и вегетативных органах

растений. К таким антибиотикам относятся фитобактериомицин, трихотецин, полимицин.

Применение антибиотиков в пищевой промышленности позволяет снизить длительность термообработки продуктов питания при их консервировании. Используемые антибиотики воздействуют на клостридиальные и термофильные бактерии, устойчивые к нагреванию. Наиболее эффективным признан низин, который практически не токсичен для человека и позволяет вдвое снизить время термообработки.

6.12. Моноклональные антитела

Моноклональные антитела (МА) — это антитела, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, т. е. произошедшими из одной клетки-предшественницы. Они могут быть выработаны почти на любое вещество, которое антитело будет специфически связывать. Их можно далее использовать для обнаружения этого вещества или его очистки.

Моноклональные антитела широко применяют в биохимии, молекулярной биологии и медицине. Если их используют в качестве лекарства, то название последнего оканчивается на -*ma*b (от англ. *monoclonal antibody*).

Впервые методика получения моноклональных антител с помощью гибридомной технологии была опубликована в 1975 г. Ж. Келером и С. Мильштейном, которые в 1984 г. получили за ее создание Нобелевскую премию. Именно они, предварительно введя в организм антиген и вызвав таким образом иммунный ответ, извлекли лимфоидную клетку, продуцирующую соответствующие антитела, и объединили ее с клеткой опухоли (миеломы) (рис. 6.15). В результате получился непрерывно делящийся клеточный гибрид (гибридома), способный синтезировать антитела с заданной специфичностью. Гибридома унаследовала от нормальной клетки способность к синтезу антител, а от опухолевой — бессмертие и способность к неограниченному и бесконтрольному росту.

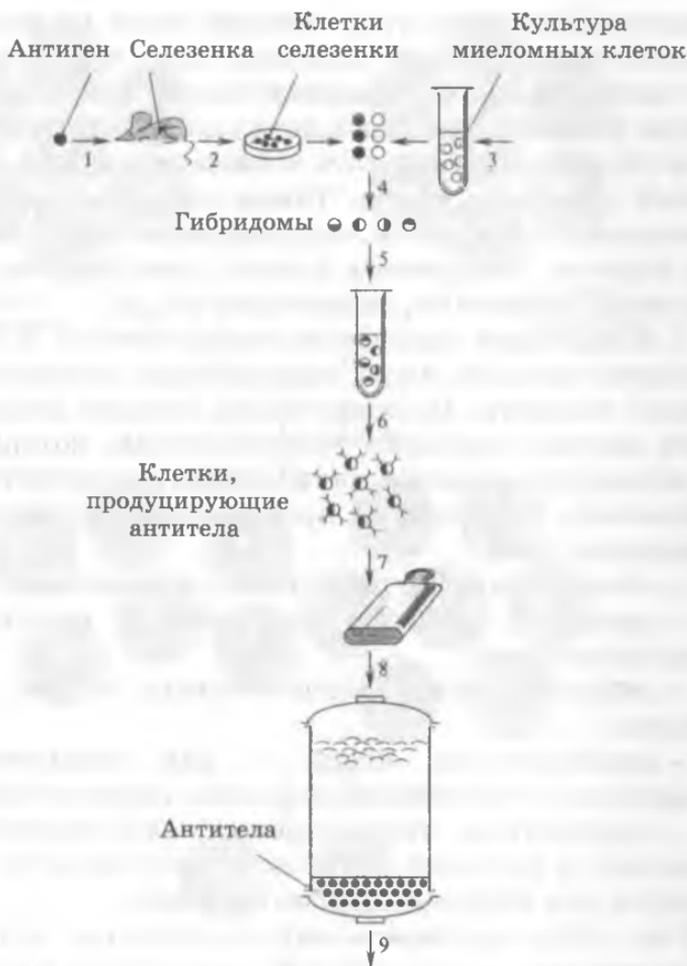


Рис. 6.15. Схема получения моноклональных антител
(по В.П. Комову и В.Н. Шведовой, 2004):

- 1 — иммунизация; 2 — выделение клеток селезенки; 3 — получение культуры миеломных клеток; 4 — гибридизация (слияние);
5 — селекция гибридом; 6 — отбор положительных клонов;
7 — культивирование; 8 — производство моноклональных тел *in vitro* в биореакторе; 9 — получение моноклональных антител

В действительности продуцировать антитела способны только единичные гибридомные клетки. Их необходимо выделять и размножать клонированием. После тестирования клонов на способность образовывать антитела отбирают

положительные культуры, которые снова клонируют и подвергают последующей селекции (рис. 6.16). В результате получают гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела. Производство моноклональных антител этими клетками осуществляют *in vitro* в биореакторе или *in vivo* в асцитной жидкости мыши. Таким способом получают моноклональные антитела к определенным антигенам бактерий или вирусов, опухолевых клеток, лимфоцитов, а также к гормонам, ферментам, медиаторам и т. д.

С появлением моноклональных антител в биологии и медицине началась эпоха современных исследований высочайшей точности. Специфичность антител делает их мощными диагностическими инструментами, которые позволяют определить наличие минимального количества искомым субстанций. В настоящее время моноклональные антитела используют для:

- обнаружения загрязнителей окружающей среды;
- проверки пищевых продуктов на наличие опасных микроорганизмов;
- распознавания злокачественных клеток среди нормальных;
- аналитических целей — как «иммунологический микроскоп» с чрезвычайно высоким разрешением;
- диагностики инфекционных заболеваний человека, животных и растений, а также в биотехнологии в качестве лигандов для аффинной хроматографии.

Уже сейчас препараты моноклональных антител широко применяют в лабораторной диагностике многих заболеваний как диагностические тест-системы.

Современная диагностика злокачественных новообразований крови немыслима без моноклональных антител. Их используют для определения иммунного статуса пациентов, диагностики и контроля эффективности лечения онкологических заболеваний, диагностики бактериальных и вирусных инфекций (гепатиты А и С, простой герпес, клещевой энцефалит, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ), для определения биологически активных веществ — белков крови, гормонов, ростовых факторов, клеточных рецепторов, медиаторов воспаления и др. Для исследования локализации злокачественного новообразования и степени

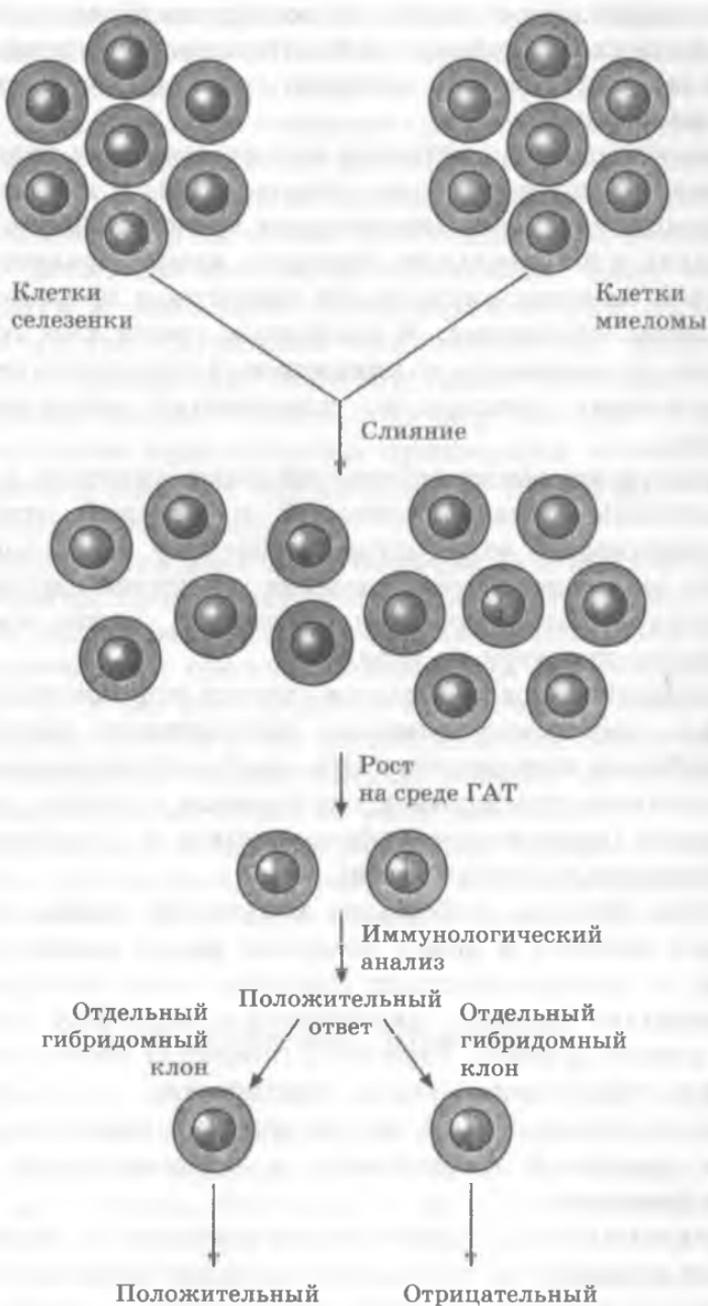


Рис. 6.16. Скрининг клеток, вырабатывающих моноклональные антитела (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002)

метастазирования используют метод введения в организм специфичных к определенной опухолевой клеточной популяции моноклональных антител, связанных с радиоактивными изотопами.

Моноклональные антитела незаменимы при диагностике заболеваний, но могут быть использованы и в качестве высокоспецифичных терапевтических средств. Они могут осуществлять избирательную доставку химиотерапевтических агентов к клеткам опухоли, не затрагивая при этом здоровые клетки организма. В настоящее время уже создано и успешно применяется в клинической практике несколько лекарственных препаратов, содержащих моноклональные антитела.

Существуют также моноклональные антитела для лечения аутоиммунных заболеваний и реакций отторжения трансплантата. В этих случаях действие моноклональных антител направлено против клеток иммунной системы, участвующих в патологических процессах; другие иммунные механизмы при этом не страдают.

Предпринимаются попытки связать моноклональные антитела с противоопухолевыми препаратами, такими, как доксорубин или ризины. Это обеспечит адресную доставку токсичного препарата к опухолевым клеткам, позволит прицельно (направленно) обнаруживать и уничтожать их, не повреждая здоровые ткани.

Таким образом, работы по получению новых моноклональных антител в целях создания на их основе лекарственных и диагностических средств очень перспективны. Они позволят вывести практическую медицину на качественно новый уровень. Терапия с помощью моноклональных антител эффективна, очень специфична, т. е. нацелена только на определенный патологический механизм, являющийся причиной заболевания, и, следовательно, сравнительно безопасна.

Одна из причин ограниченного применения этого метода терапии заключается в том, что мышинные антитела зачастую распознаются иммунной системой человека. Развивающийся при этом иммунный ответ не только выводит терапевтические антитела из организма, он может приводить к поражению

почек. Для снижения проблемы возникновения человеческих антимышиных антител (НАМА) разработчики лекарственных средств используют химерные или гуманизированные антитела. Для создания химерного антитела антигенсвязывающие зоны (вариабельные домены) мышинового антитела объединяют с эффекторными зонами (константными доменами) человеческого антитела. Для создания человеческого антитела только аминокислоты, образующие зону, взаимодействующую с антигеном (гипервариабельные регионы), заменяют соответствующими аминокислотами мышинового антитела. К препаратам, синтезируемым описанным методом, относятся Zenarax, Vitaxin, Mylotarg, Herceptin и Xolair.

Тем не менее преимущества применения моноклональных антител очевидны, что обусловило производство их в промышленном масштабе.

На сегодняшний день 20 % биофармацевтических препаратов являются продуктами гибридной технологии. Всего в мире на различных стадиях разработки находится свыше 350 лекарственных средств, содержащих моноклональные антитела, 70 % из них проходят клинические испытания. По прогнозам, к 2010 г. на рынке появится более 100 новых препаратов на основе моноклональных антител с общим объемом продаж около 50 млрд долларов.

Ряд фармацевтических фирм США, Европы и Японии производят диагностические наборы, моноклональные антитела для терапии заболеваний и лабораторной техники, а также для научных целей.

6.13. Вторичные соединения

Характерной особенностью клеток растений является способность к синтезу соединений так называемого вторичного метаболизма, к которым относятся терпеноиды, полифенолы, алкалоиды, стероиды и др. Они синтезируются, как правило, в меньших количествах, чем вещества основного (первичного) обмена, и, кроме того, не участвуют в нем.

Впервые термины «первичные соединения» и «вторичные соединения» ввел немецкий биолог А. Коссель (1891). В своей лекции «О химическом составе клеток», прочитан-

ной для Берлинского общества физиологов, он говорил: «Предлагаю называть соединения, имеющие важность для каждой клетки, первичными, а соединения, не присутствующие в любой растительной клетке, — вторичными».

Долгое время считалось, что вторичные метаболиты отличаются от первичных тем, что они:

- распространены в ограниченном числе видов растений;
- являются «конечными» продуктами первичного обмена;
- не имеют значения для образующей их клетки, но могут быть необходимы для целого растения.

В настоящее время установлена важная роль вторичных метаболитов в жизни растений. Они обнаружены у 20–30 тыс. их видов, т. е. у 10–15 % всей флоры Земли. Установлена структура уже около 100 тыс. индивидуальных веществ. Выяснено участие 15–25 % генов растительных организмов в их вторичном метаболизме. Все это свидетельствует о том, что считать эти соединения синтезированными «случайно» — неправильно.

Ученые-биологи достаточно долго не уделяли должного внимания вторичным соединениям. Гораздо больше знали о них провизоры, фармацевты и криминалисты, поскольку лекарственные и ядовитые свойства растений чаще всего обусловлены этими соединениями.

Вторичные соединения придают также вкус и аромат растениям. От их присутствия зависят окраска цветков и многообразие «расцветки» окружающего нас мира. Многие из вторичных соединений используются в качестве лекарственных препаратов, вкусовых и ароматических добавок для пищевой и парфюмерной промышленности.

Все это свидетельствует о важном народнохозяйственном значении вторичных соединений, они могут найти широкое применение в биотехнологическом производстве. Рассмотрим основные классы вторичных соединений, синтезирующихся в клетках высших растений.

Терпены (старое название — *изопреноиды*) — одни из наиболее распространенных в растениях вторичных веществ. Свое название получили от немецкого слова *terpentin* (скипидар), означающего смесь этих веществ.

К настоящему времени известно более 30 тыс. соединений данной группы вторичных метаболитов. Основным их структурным элементом является пятиуглеродное соединение — *изопрен*. Общая формула всех терпенов выражается как $(C_5H_8)_n$.

Все терпены подразделяют по единому структурному признаку — числу изопреновых единиц, входящих в состав их молекулы.

Среди терпенов встречаются также смешанные вещества, молекула которых состоит из терпеноидной и нетерпеноидной частей. Последняя может быть представлена тетрапирролом, как это характерно для хлорофилла и цитохрома, бензохиноном, что наблюдается в структуре убихинонов, а также аденином — в случае цитокининов. Такие соединения называют **меротерпенами**.

Большинство терпенов имеет название, отражающее тот растительный источник, откуда они были выделены впервые. Так, например, ментол впервые получили из растений мяты (*Mehta*), бетулапrenoлы — из листьев березы (*Betula*), авенастерин — из зерен овса (*Avena*).

Функции, выполняемые терпенами в клетках растений, чрезвычайно разнообразны. Так, важную физиологическую активность проявляют такие их представители, как цитокинины, гиббереллины и абсцизовая кислота. Моно- и сесквитерпеноидам часто приписывают аллелопатическую роль. Аллелопатия — это вредное действие одного растения (донора) на другое (реципиент). Стероиды, локализованные в клеточных мембранах растений, по-видимому, выполняют там такую же функцию, как холестерол в мембранах животных клеток. Существует предположение, что стероиды стабилизируют мембраны и контролируют их проницаемость. Каротиноиды защищают клетки от фотодинамического повреждения и, кроме того, участвуют в поглощении света при фотосинтезе. Смешанные терпеноиды также играют ключевую роль в обмене веществ у растений: хлорофилл, лишенный своей фитольной боковой цепи, не эффективен; пластохинон участвует в фотосинтетическом транспорте электронов, а убихинон — в митохондриальном транспорте электронов. Полипренилпирофосфаты участвуют

в процессе гликозилирования при образовании клеточных стенок.

Фенольные соединения, или **полифенолы**, являются вторыми по распространенности в растительном мире представителями вторичных соединений. Эти вещества, так же как и терпены, обнаружены не только во всех растениях, но даже в каждой растительной клетке. В настоящее время число известных фенольных структур превышает девять тысяч.

Фенольные соединения содержат в своей молекуле бензольное ядро с одной или несколькими гидроксильными группами. Их классификация зависит от числа ароматических колец (одно или два), а также от количества присоединенных к ним атомов углерода.

Фенольные соединения с одним ароматическим кольцом подразделяют на следующие классы:

— **соединения C_6 -ряда** — не содержат в своей структуре дополнительных атомов углерода. К ним относятся *простые фенолы*, представителями которых являются фенол (в малых количествах образующийся в хвое сосны), пирокатехин (найден в листьях тополя) и флороглюцин (чешуя лука);

— **соединения C_6 - C_1 -ряда** — имеют в своей структуре один дополнительный атом углерода (рис. 6.17). К ним относятся *оксибензойные кислоты* и их производные, которые часто называют фенольными кислотами или фенолокислотами, а также *лишайниковые кислоты* — специфические фенольные соединения, синтезируемые лишайниками;

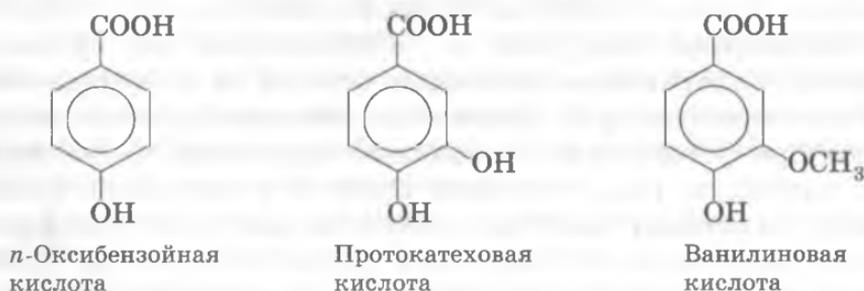


Рис. 6.17. Структурные формулы оксибензойных кислот

— соединения C_6-C_2 -ряда — соответствующие альдегиды и спирты оксibenзойных кислот, в их структуре присутствует два дополнительных атома углерода;

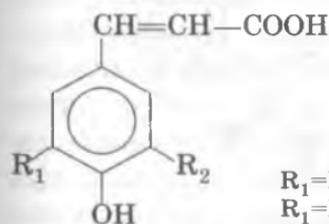
— соединения C_6-C_3 -ряда — имеют три дополнительных атома углерода и составляют наиболее многочисленную и важную группу веществ, часто называемых фенолпропаноидами (рис. 6.18). К ним относятся оксикоричные (по международной номенклатуре — гидроксикоричные) кислоты, оксикоричные (гидроксикоричные) спирты, фенолпропены, а также кумарины, изокумарины и хромоны — соединения, у которых дополнительные атомы углерода замыкаются в конденсированное лактонное кольцо; некоторые фенолпропаноиды образуют димеры, т. е. соединения типа $(C_6-C_3)_2$, которые называют лигнанами.

Фенольные соединения с двумя ароматическими кольцами подразделяют на:

— соединения $C_6-C_1-C_6$ -ряда — имеют два ароматических кольца, соединенных мостиком из одного углеродного атома. К ним относятся бензофеноны и ксантоны;

— соединения $C_6-C_2-C_6$ -ряда — имеют два ароматических кольца, соединенных двумя атомами углерода. К ним относятся стильбены (два ароматических кольца соединяются цепочкой из двух атомов углерода) и антрахиноны (два ароматических кольца соединяются двумя атомами углерода с образованием центрального конденсированного третьего кольца);

— соединения $C_6-C_3-C_6$ -ряда — имеют два ароматических кольца, соединенных тремя атомами углерода. Наиболее мно-



$R_1=R_2=\text{H}$ — *n*-Оксикоричная (*n*-кумаровая) кислота

$R_1=\text{H}; R_2=\text{OH}$ — Кофейная кислота

$R_1=\text{H}; R_2=\text{OCH}_3$ — Феруловая кислота

$R_1=R_2=\text{OCH}_3$ — Синаповая кислота

Рис. 6.18. Структурные формулы некоторых фенолпропаноидов

гочисленная группа фенольных соединений, представленная прежде всего *флавоноидами*, которые, в свою очередь, включают целый ряд подгрупп, в зависимости от степени окисления трехуглеродного кислородсодержащего (пиранового) кольца (рис. 6.19). К ним относятся *флавоны*, *антоцианы*, *флавоны*, *флавонолы*, *изофлавоноиды* и *неофлавоноиды*.

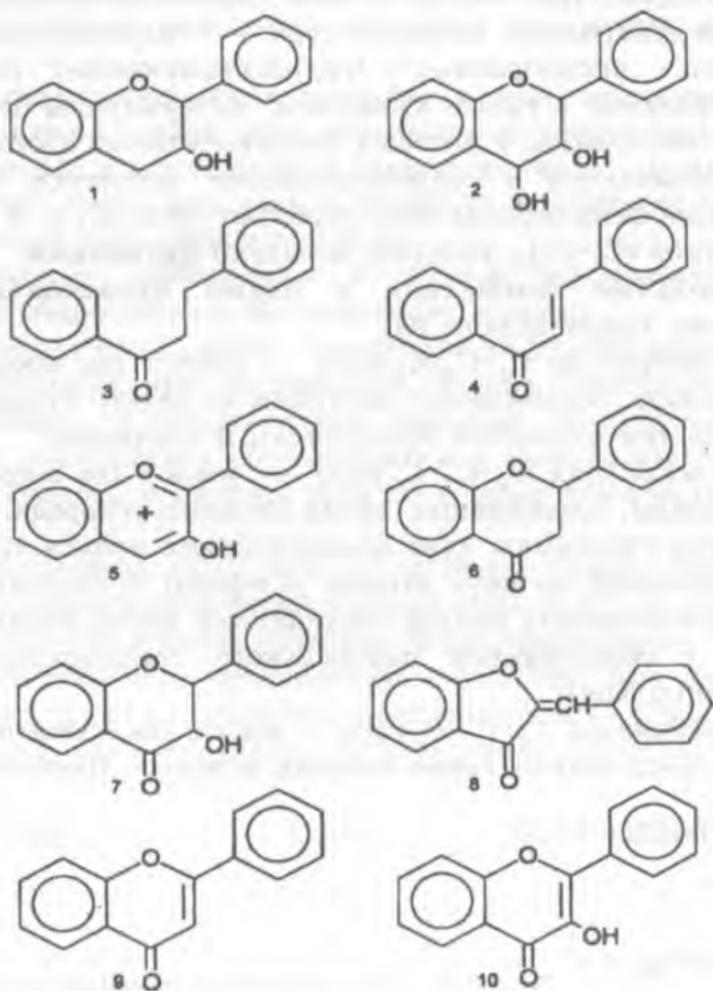


Рис. 6.19. Основные классы флавоноидов:

- 1 — катехины; 2 — лейкоцианидины; 3 — дигидрохалконы;
4 — халконы; 5 — антоцианидины; 6 — флаваноны; 7 — флаванолы;
8 — ауроны; 9 — флавоны; 10 — флавонолы

В особые группы выделяют димерные и полимерные фенольные соединения. Это *дубильные вещества* (таннины) и *лигнин*. Термин «таннины» был впервые использован для описания веществ, которые превращали сырые животные шкуры в кожу в процессе дубления (tannin). Связываясь с белками коллагена шкуры животных, таннины повышают устойчивость получаемой кожи к жаре, воде и микроорганизмам.

Наиболее распространенным полимером фенольных соединений в растениях является *лигнин*. В его образовании принимают участие три оксикоричных спирта: *конифероловый*, *пара-кумаровый* и *синаповый*. В результате биохимических превращений они и образуют лигнин, который представляет собой сильно разветвленный полимер.

Для фенольных соединений характерно формирование огромного числа соединений за счет модификаций молекулы и образования конъюгатов с разнообразными структурами. Это может происходить за счет различного замещения в бензольных кольцах (к которым в различных положениях могут присоединяться группы $-OH$, $-OCH_3$), способности образовывать гликозиды с широким набором моно- и дисахаридов, а также наличия асимметричных атомов углерода. Фенольные соединения могут также связываться с органическими кислотами, растительными аминами, алкалоидами. Помимо этого, растительные фенолы взаимодействуют с изопреноидами, образуя большую группу *пренилированных фенолов*. Такие свойства фенольных соединений обеспечивают огромное разнообразие структур, характерное для растительных фенолов.

Фенольные соединения играют важную роль в самых различных физиологических процессах — фотосинтезе, дыхании, росте и защитных реакциях растительного организма. Кроме того, они выполняют механические и структурные функции (лигнин), а также являются аттрактантами для насекомых-опылителей и животных — распространителей семян. Многие представители фенольных соединений обуславливают вкусовые качества растений. Особенно часто это отмечается для флавоноидов. Например, флавонон *на-*

рингенин придает горький вкус кожуре грейпфрута, тогда как другой флавонон — *гесперидин*, обнаруженный в кожуре апельсина и мандарина, таких свойств не проявлял. Во многих плодах (яблоки, груши, вишня, айва, персики, абрикосы) и ягодах (ежевика, земляника, брусника, смородина, малина, виноград) содержатся *катехины*, также относящиеся к соединениям флавоноидной природы. Наибольшее их содержание было отмечено в молодых побегах чайного растения (до 30 % на сухой вес). Катехины широко применяют в производстве какао, виноделии и особенно в чайной промышленности. Это связано с тем, что продукты окисления катехинов обладают характерной окраской и приятным слабовяжущим вкусом. Кроме того, они проявляют Р-витаминную активность. Часто в растениях встречается рамноглюкозид кверцетина — *рутин*, используемый в медицине как капилляроукрепляющее средство.

У 200 природных флавоноидных веществ выявлено 40 видов биологического действия. В основном оно связано с их антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием, а также влиянием на ферментные системы. Благодаря такой разнообразной активности флавоноидсодержащие растения служат сырьем для производства препаратов желчегонного, противоязвенного, капилляроукрепляющего, гипотомического действия. Флавоноиды применяют как антимуутагены, противоопухолевые и антиаллергические препараты. Так, препарат *ревенол*, получаемый из коры приморской сосны, виноградных зерен и куркумы, обладает антиоксидантной активностью, в 50 раз превышающей таковую у α -токоферола. Разработанный на основе экстракта виноградных косточек французский препарат *эндотелон* используют для лечения онкологических заболеваний.

Алкалоиды представляют собой большую группу азотсодержащих вторичных веществ, найденных у 20 % видов сосудистых растений.

Термин «алкалоид» введен в 1819 г. немецким фармакологом В. Майсснером. Чтобы особая группа азотсодержащих веществ с щелочными свойствами не была классифицирована как щелочи (*alkali*), он предложил назвать ее ал-

калоидами. Название происходит от арабского слова *alcali* — щелочь и греческого *eidos* — подобный.

Алкалоиды содержат азот, чаще всего в составе гетероциклического кольца. В настоящее время известно около 10 тыс. индивидуальных веществ.

Согласно *химической классификации*, алкалоиды — это соединения, содержащие один или несколько атомов азота в молекуле, что и придает им щелочные свойства. Обычно их подразделяют на две подгруппы: *протоалкалоиды*, которые содержат азот не в гетероцикле, и *истинные алкалоиды*, содержащие азот в гетероцикле.

Биохимическая классификация алкалоидов основана на их метаболизме. *Гликоалкалоиды*, а также ряд других алкалоидов (например, алкалоиды аконита) по типу синтеза и структуре фактически являются изопреноидами, поэтому было решено выделить их в особую группу — *изопреноидных псевдоалкалоидов*. В связи с этим сейчас принято подразделять алкалоиды на три подгруппы: *протоалкалоиды* (азот не в гетероцикле (рис. 6.20)); *истинные алкалоиды*

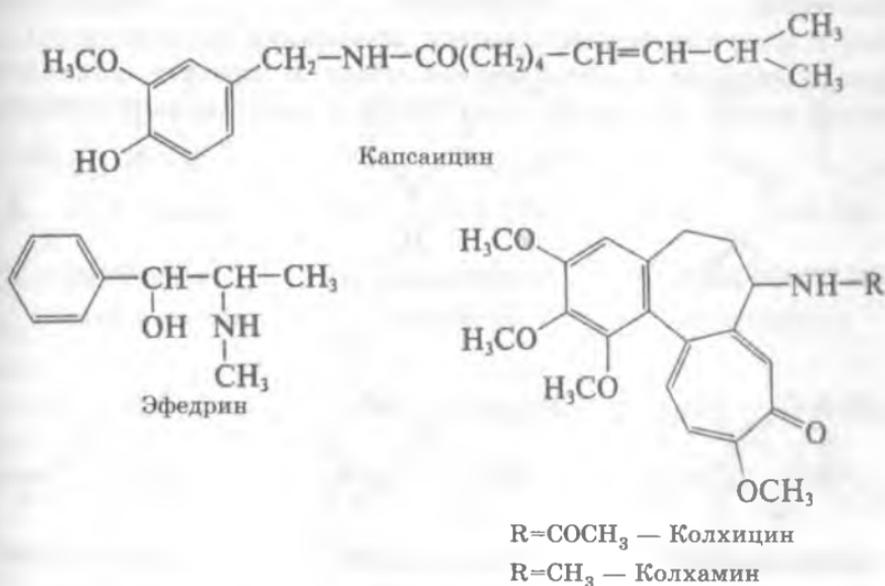


Рис. 6.20. Структура некоторых протоалкалоидов (по И.П. Ермакову и др., 2005)

(азот в составе гетероцикла (рис. 6.21)); *псевдоалкалоиды* (синтез не из аминокислот). Каждая подгруппа, в свою очередь, подразделяется на 3–10 классов.

Наиболее широко алкалоиды распространены среди покрытосеменных растений. Особенно богаты ими семейства маковых, пасленовых, бобовых, кутровых, мареновых, лю-



Рис. 6.21. Основные группы истинных алкалоидов (по И.П. Ермакову и др., 2005)

тиковых. Во мхах, папоротниках и голосеменных алкалоиды встречаются относительно редко. Разные органы и ткани растения могут содержать разные алкалоиды. Обычно их концентрация невелика и составляет десятые и сотые доли процента. При содержании алкалоидов около 1–3 % растение считается богатым этими соединениями (алкалоидоносным). Только немногие растения, например культивируемые формы хинного дерева, могут накапливать до 15–20 % алкалоидов.

Алкалоиды могут оказывать токсическое действие на человека. Однако их малые дозы используют в качестве эффективных фармакологических препаратов (морфин, кодеин, эфедрин, атропин). Некоторые алкалоиды (никотин, кофеин) применяют как стимуляторы или седативные средства.

Цианогенные гликозиды и глюкозинолаты также являются азотсодержащими веществами (рис. 6.22). Их иногда называют прототоксинами или фитоантисипинами. Они принимают непосредственное участие в защите растений от травоядных животных. При гидролизе цианогенных гликозидов специфичной гликозидазой выделяется синильная кислота.

Цианогенные гликозиды широко распространены в растительном царстве и часто встречаются у представителей бобовых, розоцветных и некоторых злаков. Их много также

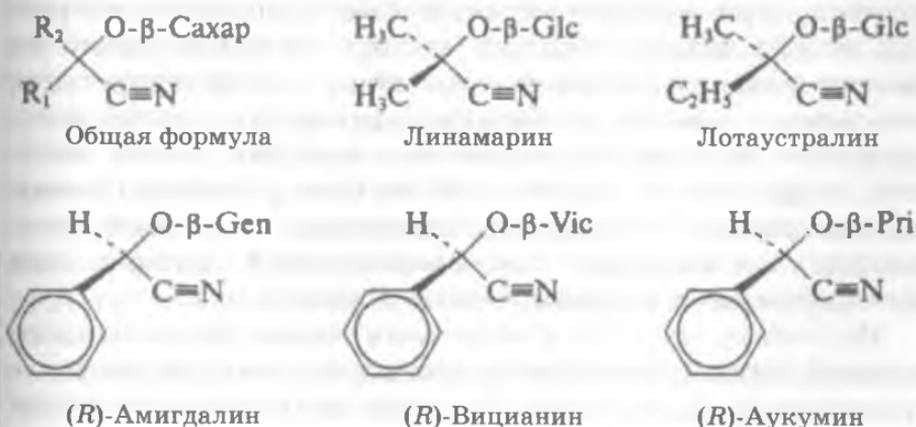


Рис. 6.22. Цианогенные гликозиды высших растений

в крахмалистых клубнях маниока *Manihot esculenta*. Это важный пищевой продукт в ряде тропических стран. Клубни и мука маниока — обычная пища для аборигенов, которые научились в процессе приготовления избавляться от токсичных соединений.

Вторая важная группа растительных прототоксинов — *глюкозинолаты* — впервые была выявлена у растений семейства крестоцветных *Cruciferae*. В растении глюкозинолаты, так же как и цианогенные гликозиды, пространственно отделены от гидролизующих их ферментов. При повреждении растительных тканей происходит смешивание глюкозинолатов с соответствующими ферментами и превращение их в летучие токсичные вещества с горчичным запахом — *изотиоцианаты* и *нитрилы*. Образующиеся вещества функционируют как токсины и репелленты для травоядных животных. Большинство исследований, посвященных глюкозинолатам, выполнено на рапсе *Brassica napus*, который служит важным источником для получения пищевого растительного масла в Северной Америке и Европе. Одна из основных задач селекционеров состоит в получении семян рапса с резко сниженным содержанием глюкозинолатов.

Таким образом, в растениях синтезируются различные соединения вторичного метаболизма. Их группы находятся в растении в динамическом состоянии, а содержание меняется от органа к органу в ходе онтогенеза. Поэтому, с одной стороны, при проведении скрининга желательно собрать как можно больше образцов разных частей растений на разных фазах развития, а с другой — при интерпретации полученных данных необходимо сравнивать данные о содержании изучаемого соединения в сходных частях растений, отобранных на одной и той же фазе развития. Очевидно, что данные о динамике содержания вторичных метаболитов представляют непосредственный интерес при проведении хемотаксономических исследований.

Поскольку многие из вторичных метаболитов обладают высокой биологической активностью, они находят широкое практическое применение. И в этом плане перспективным источником их получения могут быть каллусные и суспензионные культуры высших растений.

Культуры *in vitro* — продуценты вторичных соединений. Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей в условиях *in vitro* позволяют использовать их для практического применения. Особый интерес представляет способность изолированных клеток, тканей и органов синтезировать вещества вторичного метаболизма, которые широко применяют в медицине, ветеринарии, кормопроизводстве, пищевой промышленности, парфюмерии, для защиты растений и др.

Интерес исследователей к этому направлению работ не случаен. По сравнению с использованием традиционного растительного сырья, получение физиологически активных веществ методами клеточной биотехнологии имеет ряд преимуществ, так как:

- процесс получения биомассы клеток автоматизирован и не зависит от сезона, климатических и почвенных условий;
- можно оптимизировать условия культивирования суспензии клеток, позволяющих синтезировать в необходимом количестве нужные вещества.

Использование клеточных культур растений для получения вторичных метаболитов важно и в тех случаях, когда:

- невозможно выращивание растения в природе;
- имеются трудности в его сборе;
- содержание вторичных соединений в культурах *in vitro* высокое или высока его цена на мировом рынке;
- возможен хороший рост клеточных культур растений на сравнительно простых по составу питательных средах;
- вторичное соединение (соединения) выделяется клетками в питательную среду;
- можно получить высокопродуктивные растительные культуры.

Основным условием культивирования изолированных клеток и тканей в условиях *in vitro* является тот факт, что они, так же как и интактные растения, синтезируют вторичные метаболиты.

Первые данные, касающиеся синтеза вторичных соединений в клеточных культурах растений, появились в литературе в 1940 г., когда Дж. Боннер сообщил об образовании каучука клетками гваюлы. Первыми лекарственными

растениями, исследованными в культуре ткани, были барвинок розовый и белена черная. Исследования В. Телле и Ф. Готре доказали способность культуры ткани белены к синтезу алкалоидов. Позднее появились и другие сообщения о получении культур тканей различных лекарственных растений, способных синтезировать многие уникальные соединения вторичного метаболизма. Это культуры ткани табака, накапливающие большие количества никотина (0,7 %), диоскореи — диосгенина (1,6 %) и др.

В отделе биологии клетки и биотехнологии Института физиологии растений РАН собрана большая коллекция используемых в промышленности клеточных культур растений, синтезирующих вторичные метаболиты. Это культуры женьшеня дальневосточного (источник алкалоида диосгенина), диоскореи дельтовидной (источник стероидных гликозидов), раувольфии змеиной (продуцент антиаритмического алкалоида аймалина), стевии (источник заменителя сахара — стевиозида) и др. В последние годы большое внимание в мире уделяется культивированию клеток тиса ягодного, синтезирующего уникальное вещество терпеноидной природы — таксол, который является противораковым препаратом.

Использование культур *in vitro* для получения вторичных соединений связано с их высокой продуктивностью. Экспериментально доказано, что прирост клеточной биомассы в условиях *in vitro* и *in vivo* проходит с разной скоростью. Например, за год прирост корня женьшеня в тайге составляет 1 г, на плантации — 3 г, а при выращивании клеток корневого происхождения на агаре (*in vitro*) можно получать 0,4 г сухой массы на литр среды в день. Биомасса клеток женьшеня в суспензии при выращивании в 50-литровом ферментере увеличивается до 2 г в литре среды за сутки, что в тысячу раз больше, чем при выращивании на плантации. Учитывая высокую стоимость женьшеня (килограмм плантационного корня стоит 100–150 долларов), цена дикорастущего корня может достигать до нескольких тысяч долларов. Поэтому с экономической точки зрения биотехнологический способ получения биомассы культуры клеток женьшеня весьма перспективен.

Вещества вторичного синтеза, как правило, получают из суспензионной культуры, которую выращивают в биореакторах или ферментерах. Важной характеристикой клеток популяции является ее стабильность в отношении синтеза метаболитов. Она может сохраняться в течение всего времени существования популяции, постепенно снижаться за счет медленного увеличения числа клеток с низким синтезом метаболитов или быть нестабильной в случае быстрой потери способности клеток синтезировать вторичные метаболиты.

Технология выращивания культур клеток в биореакторах представляет собой масштабный процесс. Специалисты немецкой фирмы DIVERSA (ныне — FYTON) осуществили выращивание ряда культур в биореакторах объемом до 75 тыс. л. В России на Омутнинском биохимическом заводе в биореакторах объемом до 2,5 м³ в промышленном масштабе получили биомассу женьшеня. В ТОО «Тэмбр» (г. Ярославль) осуществлено проточное культивирование клеток женьшеня в промышленных биореакторах объемом 7,5 м³. В Институте физиологии растений РАН оптимизированы режимы культивирования целого ряда различных культур клеток высших растений (женьшеня настоящего, полисициаса и других аралиевых, диоскореи дельтовидной, маральего корня и др.) в биореакторах объемом 630 л.

Российские ученые разработали технологию, жизненно важную для десятков тысяч пациентов. Она позволяет получать практически любое требуемое количество *паклитаксела* — основы одного из самых эффективных, но и самых дорогих препаратов для лечения некоторых видов онкологических заболеваний, в том числе рака легкого, яичников и молочной железы. Субстанция, полученная по новой технологии, по структуре ничем не отличается от обычной, но стоит будет, по мнению авторов, существенно дешевле. Дело в том, что высокая цена паклитаксела — это не прихоть фармацевтов, а следствие огромных затрат на его производство. В природе он есть только в коре очень редкого и очень медленно растущего дерева — тихоокеанского тиса. Чтобы выделить количество, необходимое для лечения только одного пациента, нужно собрать кору с 10—

12 взрослых деревьев. Понятно, что такое лекарство дешевым просто не может быть. Разумеется, что, обнаружив удивительные свойства паклитаксела, ученые искали способы более дешевого его получения. Были разработаны и методы химического синтеза, и способ получения полупродукта из хвои тиса с последующей его переработкой в паклитаксел. Но оказалось, что синтетический аналог существенно дороже вещества, выделенного из природного сырья.

Метод же, который предлагают использовать специалисты ОАО «Биохиммаш», относится к области биотехнологии. Это ценное лекарство ученые научились выделять из природного сырья. Но не из деревьев, а из культуры клеток тиса, выращенных в ферментере и способных эффективнее прочих вырабатывать искомую субстанцию.

Продуктивность клеточных культур высших растений в отношении синтеза вторичных веществ зависит также от состава питательной среды, используемой для их выращивания.

Обязательными компонентами питательных сред являются *углеводы*. Клеточные культуры могут расти на различных углеводах (испытано более 30 различных соединений), но в большинстве случаев их лучший рост отмечается при добавлении в питательную среду двух сахаров — глюкозы или сахарозы. В то же время высокий уровень синтеза свойствен культурам, растущим на сахарозе, а на питательных средах с глюкозой синтез часто сильно ослаблен. Причины этого явления пока не ясны. Повышенные концентрации сахарозы (5 %) в среде эффективны для роста культуры диоскореи, а пониженные (1,5 %) — для продуктивности диосгенина.

Минеральный состав питательных сред также оказывает большое влияние на синтез вторичных соединений; при этом наиболее важно содержание фосфора, калия и различных форм азота. Высокие концентрации фосфора в большинстве случаев приводят к улучшению роста культуры и ослаблению синтеза вторичных метаболитов. Это отмечено для синтеза никотина в культуре клеток табака, антоцианов — в культивируемых клетках моркови, катехинов — в каллусах чая. Накопление вторичных веществ в культурах *in vitro* обычно начинается после истощения фосфора из среды.

Имеются данные о том, что повышение концентрации фосфора в питательной среде увеличивало содержание алкалоидов в культуре барвинка розового и антрахинонов в культуре клеток *Galium sp.*

Показано, что как для роста, так и для синтеза вторичных соединений необходимы минеральные формы азота. При этом органические формы (пептон, дрожжевой экстракт и др.) тормозят и рост, и синтез. Очень важно соотношение аммонийного и нитратного азота. Можно проследить определенную тенденцию: повышение доли нитратного азота способствует увеличению синтеза вторичных веществ, в частности диосгенина, в культуре клеток диоскореи.

Фитогормоны как компоненты питательных сред привлекают наибольшее внимание исследователей. Однако влияние гормонов на синтез вторичных соединений в культуре клеток неоднозначно и может меняться, в зависимости от класса вторичных соединений, физиологического состояния культуры, условий культивирования и др.

Наиболее интенсивно изучались *ауксины* и *цитокинины*, поскольку они являются необходимыми компонентами питательных сред. Имеется множество примеров, когда ауксины стимулировали или подавляли синтез вторичных соединений. Ауксины стимулировали синтез антоцианов в культурах моркови и тополя, антрахинонов — в *Cassia fistula* и *Cassia torra*, сапогенинов — в тригонелле; уменьшали и исключали синтез антрахинонов и шиконина в воробейнике, скополамина — в гиосциамусе, хлорогеновой кислоты — в табаке.

Достаточно часто влияние ауксинов на синтез вторичных метаболитов зависит от их природы. Так, синтез никотина в табаке стимулируется НУК и ИУК, но тормозится 2,4-Д; синтез антоцианов и нафтахинонов в клетках культуры *Plumbago zeylanica*, наоборот, стимулируется повышенными концентрациями 2,4-Д и тормозится ИУК и НУК. В целом 2,4-Д чаще, чем ИУК и НУК, отрицательно влияет на синтез вторичных соединений.

Результатов по влиянию цитокининов на синтез вторичных соединений существенно меньше, что не позволяет выявить какие-либо закономерности. Например, бензиламино-

пурин стимулировал синтез стероидных сапогенинов в культуре паслена, а кинетин также стимулировал синтез алкалоидов в клетках скополии, но полностью ингибировал синтез никотина в культуре клеток табака.

Результаты по другим классам фитогормонов весьма фрагментарны и противоречивы.

Изучению *влияния предшественников* синтеза вторичных метаболитов на продуктивность клеточных культур посвящено значительное число работ. В большинстве случаев добавление их к питательной среде не приводило к существенному увеличению продуктивности клеток. По всей видимости, концентрация предшественников не является определяющим фактором для синтеза вторичных соединений в культуре.

Все это свидетельствует о том, что, используя различные комбинации питательных сред, можно повысить продуктивность клеточных культур высших растений и эффективность синтеза вторичных веществ.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие соединения относятся к первичным и вторичным метаболитам?
2. Перечислите определяющие факторы биотехнологического процесса.
3. Какие этапы составляют промышленный биотехнологический процесс?
4. Расскажите о подготовительной стадии промышленного биотехнологического процесса.
5. Какая стадия является основной стадией биотехнологических производств?
6. Что является главной целью биотехнологической стадии и какие методы используются для ее проведения?
7. Сколько продуктов может быть получено в конце биотехнологической стадии?
8. Какие методы можно использовать для отделения жидкости от биомассы?
9. Какие методы следует использовать для выделения продуктов, полученных на биотехнологической стадии?
10. Какие существуют отличия при выделении внеклеточных и внутриклеточных продуктов?

11. Для чего необходима стадия очистки продукта в биотехнологическом процессе?
12. Какие методы необходимо использовать для очистки продукта?
13. Что происходит с продуктом биотехнологического производства на стадии концентрирования?
14. Как называется последняя стадия биотехнологического производства и какова ее цель?
15. Перечислите продукты, получаемые в процессе биотехнологического производства.
16. Что такое блок-схема? Дайте определение и расскажите о ней.
17. Чем отличаются биотехнологические производства от химических?
18. Расскажите о важнейших веществах всех живых организмов — белках.
19. Что такое белок одноклеточных организмов, каков его состав и где он находит применение?
20. Какие углеродсодержащие субстраты используют микроорганизмы для синтеза белка?
21. Расскажите о микопротеине, его получении и использовании.
22. Какие аминокислоты являются незаменимыми для человека, а какие — для сельскохозяйственных животных?
23. В каких отраслях народного хозяйства наиболее широко используются аминокислоты?
24. Какие способы применяют для получения аминокислот? Расскажите о преимуществах каждого из них.
25. Как осуществляется биотехнологическое получение аминокислот?
26. Что такое репрессия и ретроингибирование?
27. Какие виды микроорганизмов являются сверхпродуцентами аминокислот?
28. Каково значение соматотропного гормона в жизни человека?
29. Расскажите о получении соматотропина.
30. Какой биотехнологический метод используют для получения соматостатина? Расскажите о нем.
31. Что такое инсулин и каково его значение в жизни человека?
32. Какие методы используют для получения инсулина?
33. Расскажите о биотехнологическом методе получения инсулина.
34. Что такое моноклональные антитела и где они применяются?
35. Перечислите преимущества использования моноклональных антител, по сравнению с поликлональными антителами.
36. Что такое витамины и какова их роль?
37. Расскажите о микробиологическом синтезе витамина B_{12} .
38. Что известно о промышленном получении витамина B_2 ?

39. Как в промышленных масштабах получают эргостерин?
40. К каким соединениям относятся интерфероны и каковы их свойства?
41. Перечислите основные классы интерферонов.
42. Какое действие оказывают интерфероны на организм человека?
43. Расскажите о способах получения интерферонов.
44. Перечислите биотехнологические способы получения вакцин.
45. Какие вещества называют антибиотиками?
46. На чем основана классификация антибиотиков?
47. Расскажите о биотехнологии промышленного получения антибиотика.
48. Какие соединения относят к вторичным метаболитам?
49. Расскажите о терпенах, их структуре и функциях.
50. Перечислите основные классы фенольных соединений.
51. Какие соединения являются алкалоидами?
52. Перечислите основные группы алкалоидов.
53. Расскажите о цианогенных гликозидах.
54. Какие преимущества при получении вторичных метаболитов имеют клеточные культуры, по сравнению с растениями?
55. Какие компоненты питательных сред способствуют повышению образования вторичных метаболитов в клеточных культурах растений?
56. Что известно о действии предшественников на синтез вторичных метаболитов?

Глава 7

ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

7.1. Роль и значение ферментов

Ферменты, или энзимы, — это биологические катализаторы, обладающие способностью избирательно катализировать многие химические превращения как в живой клетке, так и вне организма. Еще русский физиолог И.П. Павлов называл их истинными двигателями всех природных процессов.

Ферменты нетоксичны, работают при нормальных условиях, обладают высокой специфичностью и эффективностью действия, сохраняют свои свойства вне клетки. Все это позволяет применять их в качестве экологически чистых и недорогих биокатализаторов для технологических процессов в химической, текстильной, кожевенной, пищевой, сельскохозяйственной и других отраслях промышленности.

Значительна роль ферментов в фармакологии и медицине (рис. 7.1). Их широко используют в заместительной терапии при лечении большого числа заболеваний. Так, амилазы, липазы, пепсин, трипсин и химотрипсин (в виде ферментных препаратов и их смесей — фестал, панзинорм, мезим и др.) применяют для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта и печени; протеазы — для лечения злокачественных новообразований; плазмин (фибринолизин), стрептокиназу, урокиназу — для растворения тромбов в кровеносных сосудах; β -галактозидазу — для восстановления способности к усвоению молочных продуктов у людей, страдающих недостаточностью этого фермента в желудочно-кишечном тракте. Эластаза задерживает развитие атеросклероза.

Изменение уровня активности определенного фермента или соотношения его множественных форм и изоферментов



Рис. 7.1. Использование ферментных препаратов в промышленности (по И. Хиггинсу и др., 1988)

позволяет проводить диагностику заболевания того или иного органа (энзимодиагностика). Например, повышение в сыворотке крови активности фруктозо-1,6-дифосфатаальдозы свидетельствует об инфекционном гепатите, раке печени, инфаркте миокарда; повышение в плазме крови активности креатинкиназы — о мышечной дистрофии, а возрастание активности аланинаминотрансферазы — о болезнях печени и т. д.

Ферменты применяют при создании новых технологий очистки сточных вод, а также при использовании содержащихся в них веществ. Например, во Франции активно внедряется новая технология производства кормовых белков из аминокислот и пептидов сточных вод. Она основана на открытой А.Я. Данилевским в 1886 г. реакции пластеинообразования (образование белковоподобных веществ — пластеинов), в которой участвуют протеолитические ферменты.

Источником для крупномасштабного выделения ферментов служат организмы, в которых содержание требуемого фермента составляет не менее 1 %. К ним относятся бактерии (рис. 7.2), некоторые растения (например, проростки злаков, бобовых растений), отдельные ткани и органы животных (например, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта).

Широкое применение ферментативных препаратов определяет темпы их производства и потребления. Лидерами этого направления на мировом рынке являются США, Япония и страны Западной Европы. Так, объем продаж ДНКазы составил в 2000 г. примерно 100 млн долларов.

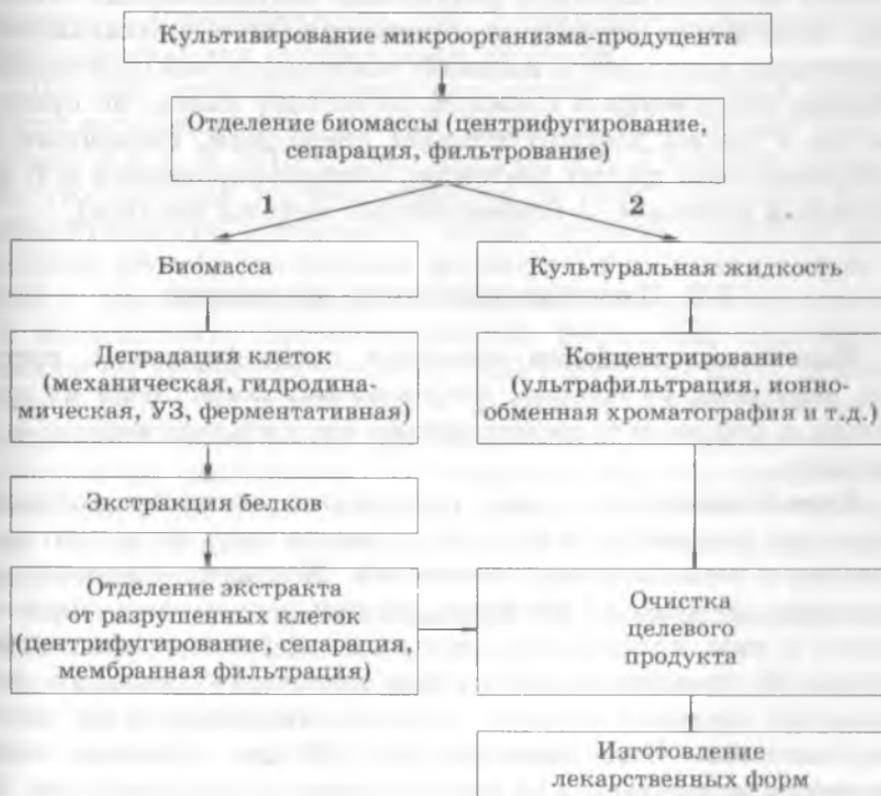


Рис. 7.2. Технология получения ферментов биотехнологическими методами:

1 — внутриклеточные ферменты; 2 — внеклеточные ферменты
(по И. Хиггинсу и др., 1988)

В то же время препараты чистых ферментов имеют ряд недостатков: они достаточно дороги, нестабильны и быстро разрушаются при хранении либо требуют специальных условий хранения (низкая отрицательная температура — до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, добавление коферментов и субстратов), их невозможно использовать многократно, трудно отделить от исходных субстратов и продуктов реакции.

Решить эти проблемы удалось с помощью *инженерной энзимологии* — науки, появившейся в 1960-е гг. и создавшей иммобилизованные ферменты. Достижения инженерной энзимологии дали начало развитию нового направления аналитической химии — *безреагентных методов анализа*, основанных на использовании различных биохимических сенсоров. Наличие в устройстве биоматериала с уникальными свойствами позволяет с высокой селективностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси, не прибегая ни к каким дополнительным операциям, связанным с использованием других реагентов, концентрированием и т. д. (отсюда и название — безреагентные методы анализа).

7.2. Иммобилизованные ферменты

Иммобилизованными называют такие ферменты, которые выделены из клетки, искусственно закреплены на носителе и сохраняют свойственную им каталитическую активность.

Иммобилизация — это технология, согласно которой молекулу фермента включают в какую-либо фазу или соединяют с нерастворимым носителем. Комплекс «фермент — носитель» отделен от раствора, но при этом может обмениваться с ним молекулами субстрата, эффектора или ингибитора. В промышленных целях для иммобилизации используют главным образом энзимы, выделенные из микроорганизмов. Они примерно в 100 раз дешевле, чем ферменты животного или растительного происхождения, и более доступны.

По сравнению со свободными ферментативными препаратами, иммобилизованные ферменты имеют существенные преимущества:

— они обладают высокой стабильностью, в несколько тысяч раз превышающей стабильность свободных ферментов, и поэтому достаточно долговечны;

— они легко отделимы от реакционной среды, что позволяет получать чистые продукты реакции;

— иммобилизация дает возможность многократно использовать ферментативный препарат;

— иммобилизованные ферменты технологичны, что позволяет либо вести процесс непрерывно, регулировать его скорость и, соответственно, выход продукта, либо в любой момент остановить реакцию;

— с помощью подбора носителей и методов иммобилизации можно целенаправленно изменять некоторые свойства ферментов (специфичность, рН- и температурозависимость, стабильность) для оптимизации процесса.

Процесс иммобилизации как способ сохранения активности выделенного из клетки фермента был открыт еще в начале XX в. В 1916 г. Дж. Нельсон и Е. Гриффин показали, что сахараза, адсорбированная на угле, сохраняла свою каталитическую активность. Однако первый патент на применение иммобилизованных ферментов был выдан только в 1939 г. Дж. Пфанмюлеру и Г. Шлейху, которые предложили использовать протеолитические ферменты, адсорбированные на древесных опилках, для обработки шкур животных. В 1953 г. Н. Грубхофер и Д. Шлейт разработали принципиально новый метод для иммобилизации ферментов — ковалентное связывание. Что касается термина «иммобилизованные ферменты», то он был узаконен в 1971 г. на первой конференции по инженерной энзимологии, которая проходила в США.

Носители для иммобилизации ферментов должны обладать определенными свойствами:

— высокой биологической и химической стойкостью;

— нерастворимостью;

— высокой механической прочностью;

— значительной гидрофильностью, которая обеспечивает связывание фермента с носителем в водной среде;

— достаточной проницаемостью для ферментов, коферментов, субстратов и продуктов реакции, пористостью, большой удельной поверхностью;

— легкостью активации комплекса «фермент — носитель»;

— возможностью создания различных структур (мембран, пластин, трубочек, гранул);

— низкой стоимостью.

В зависимости от структуры, носители подразделяют на природные и синтетические, органические и неорганические, полимерные и низкомолекулярные.

Природные полимерные носители по своей химической природе подразделяют на белковые (кератин, фиброин, коллаген, желатин), полисахаридные (целлюлоза, декстран, агароза, каррагинан, альгиновые кислоты и их соли, аминопалисахариды — хитин и хитозан) и липидные (модель «фермент — липид» в виде монослоя или бислоя сферической формы — липосома), наиболее приближенные к естественным комплексам, существующим в клетке.

Синтетические полимерные носители подразделяют на три группы — полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные. Благодаря разнообразию, механической прочности и доступности, они широко используются для иммобилизации. Кроме того, при производстве синтетических полимеров можно значительно разнообразить их форму (гранулы, трубочки и т. д.), варьировать величину пор, вводить различные функциональные группы.

Носители неорганической природы могут быть представлены материалами из глины, стекла, керамики, силикагеля, графитовой сажи, а также оксидами металлов и т. д. Преимущества этой группы носителей состоят в легкости регенерации, возможности получения любой их формы при производстве и вариабельности размера пор.

Методы иммобилизации ферментов. Иммобилизацию ферментов можно осуществлять физическими и химическими методами (рис. 7.3).

Физические методы основаны на адсорбции фермента на нерастворимом носителе, на включении фермента в поры поперечносшитого геля, в полупроницаемые структуры.

Адсорбция ферментов на нерастворимом носителе. Молекула фермента удерживается на поверхности носителя благодаря электростатическим, гидрофобным, дисперсион-



Рис. 7.3. Методы иммобилизации ферментов:
 Ф — фермент (по Т.А. Егоровой и др., 2003)

ным взаимодействиям или возникновению водородных связей. Прочность связывания фермента с носителем небольшая.

Иммобилизация ферментов путем включения в гель (обычно — полимерный гель). Метод обеспечивает равномерное распределение фермента в объеме носителя, достаточно прост и применяется для иммобилизации отдельных молекул определенного энзима, мультиферментных комплексов и интактных клеток. Однако он непригоден для работы с ферментами, которые воздействуют на водонерастворимые субстраты.

Иммобилизация в полупроницаемые структуры. В этом случае раствор фермента и раствор субстрата разделяют с помощью полупроницаемой мембраны (микрокапсулирование, включение в липосомы). Метод используется главным образом в фундаментальных научных исследованиях и в медицине.

Использование *химических методов* приводит к возникновению ковалентных связей между ферментом и носителем. Этот способ получения промышленных биокатализаторов наиболее распространен.

Химическое присоединение энзима к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи. Однако химические методы иммобилизации сложны и дороги, но незаменимы в научных исследованиях при создании ферментов с контролируемыми свойствами. Рассмотрим некоторые из этих методов.

Иммобилизация на носителях, несущих гидроксигруппы. В этой группе наиболее распространен бромциановый метод, который позволяет связывать фермент с полисахаридным или синтетическим носителем.

Иммобилизация на носителях, несущих аминокислотные группы. Аминокислотные группы носителя превращают в соли диазония, к которым впоследствии присоединяют молекулы ферментов за счет взаимодействия с фенольными, аминными, имидазольными, тиольными, гуанидиновыми группами этих ферментов.

Иммобилизация на носителях, несущих сульфгидрильные группы. Если и носитель, и фермент несут сульфгидрильные группы, то под воздействием кислорода воздуха эти группы легко окисляются с образованием дисульфидных связей.

Среди всех методов иммобилизации оптимальным считается метод включения ферментов в полимерные гели. Также широко распространены адсорбционное присоединение и химические методы, основанные на ковалентном связывании. Достаточно часто иммобилизацию проводят за счет включения ферментов в мембраны и микрокапсулы, тогда как другие приемы используют в единичных случаях.

Применение иммобилизованных ферментов. Иммобилизованные ферменты находят широкое применение в различных отраслях народного хозяйства:

— в промышленности — в качестве активных компонентов стиральных и моющих средств, в дубильных процессах, в пищевых производствах, например при обработке мяса; в качестве катализаторов при проведении различных технологических процессов, для анализа различных веществ;

— в медицине — в качестве противовоспалительных, тромболитических и фибринолитических препаратов;

— в фармацевтике — в медицинской диагностике при анализе лекарственных веществ белковой природы;

— в качестве биокатализаторов в биотехнологических производствах.

Созданы искусственные аналитические системы для анализа различных веществ — ферментные электроды, проточные анализаторы и т. д. В настоящее время разрабатываются новые поколения биодатчиков на базе аффинных взаимодействий.

О широком применении ферментов в медицине уже шла речь выше. Однако использование белковых препаратов в качестве лекарственных средств может быть ограничено их иммуногенностью, аллергенностью, малым временем действия в организме человека или животного. В связи с этим в медицине более перспективно применение иммобилизованных ферментов, которые менее аллергенны и иммуногенны, более стабильны, обладают пролонгированным действием. Например, при включении в липосомы ферменты защищены от эндогенных протеиназ организма пациента, а сами липосомы утилизируются в организме. В иммобилизованном виде применяют тромболитические ферменты, предотвращающие образование тромбов в кровеносных сосудах. Иммобилизованные протеолитические ферменты помогают при лечении ожогов, абсцессов, ран. Иммобилизованная уреаза используется в аппарате «искусственная почка». Микрокапсулы, заполненные аспарагиназой, применяют для лечения аспарагинзависимых опухолей.

7.3. Иммобилизованные полиферментные системы

Первая искусственная биферментная система, включающая ковалентно связанные с носителем иммобилизованные ферменты — гексокиназу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, была создана в 1970 г. К. Мосбахом. В настоящее время известно несколько десятков иммобилизованных полиферментных систем, состоящих из двух, трех, четырех и более энзимов. Эффективность таких комплексов намного выше, чем у свободных ферментов, за счет локального концентрирования субстрата около второго и всех последующих ферментов, входящих в систему.

Иммобилизованные полиферментные системы применяют в промышленных технологиях, иногда — в научных исследованиях при изучении метаболизма клеток, транспортных процессов и т. д. Следует, однако, отметить, что результаты, полученные с помощью таких систем, не всегда правильно отражают процессы, происходящие в клетках. Это объясняется тем, что в живых клетках комплексы энзимов чаще всего располагаются упорядоченно в мембранах

клетки, что позволяет регулировать скорость протекания ферментативных процессов, тогда как в полиферментных комплексах иммобилизованные ферменты связываются с носителем случайным образом.

Современные методы иммобилизации позволяют создавать не только полиферментные комплексы, связывать с носителями удается субклеточные структуры и даже целые клетки. Такие системы очень удобны, поскольку можно, не выделяя чистые ферментные препараты, получать естественные полиферментные системы, осуществляющие многостадийные процессы.

7.4. Биосенсоры

Биосенсоры — это аналитические устройства, в которых чувствительный слой, содержащий биологический материал, реагирует на присутствие определяемого компонента и генерирует электрический сигнал, функционально связанный с наличием и концентрацией этого вещества. Биоматериалом могут служить ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены/антитела, липосомы, органеллы, рецепторы, ДНК, а также клетки, которые иммобилизованы на физических датчиках. Следовательно, биосенсорная технология сочетает в себе достижения биологии и современной микроэлектроники.

Идея создания такого рода устройств возникла сравнительно недавно, в 1960-х гг. Впервые ее высказали Л. Кларк и К. Лионе в 1967 г. Идея Кларка состояла в использовании ферментного электрода, т. е. электрохимического датчика с иммобилизованным на его поверхности ферментом. Затем в обиход вошло понятие «биосенсор».

Большинство биосенсоров используется для анализа биологических жидкостей. Так, в крови находятся тысячи различных соединений, и бывает необходимо быстро и эффективно определить концентрацию нужного соединения, например глюкозы. Для людей, страдающих диабетом, это жизненно важный клинический анализ. Биосенсоры обеспечивают такую возможность.

Функционально биосенсоры сопоставимы с датчиками живого организма — биорецепторами, способными преобра-

зовывать все типы сигналов, поступающих из окружающей среды, в электрические.

Принципы конструирования биосенсоров. Конструктивно биосенсор представляет собой устройство, состоящее из двух преобразователей, или трансдьюсеров, — биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом (рис. 7.4).

Биохимический преобразователь сигнала (или **биотрансдьюсер, биоселектор**) выполняет функцию биологического элемента распознавания, преобразуя определяемый компонент (а точнее, информацию о химических связях) в физическое или химическое свойство или сигнал. В этом качестве выступают все типы биологических структур: ферменты, антитела, рецепторы, нуклеиновые кислоты и даже живые клетки.

Физический преобразователь сигнала (или **трансдьюсер**) преобразует определяемый компонент (а точнее, концентрационный сигнал) в электрический с помощью специальной аппаратуры. Для считывания и записи информации используют электронные системы усиления и регистрации сигнала. Существует большое разнообразие физических трансдьюсеров: электрохимические, спектроскопические, термические, пьезоэлектрические, различного рода оптические преобразователи, гравитационные, калориметрические, резонансные системы и т. п.



Рис. 7.4. Схема биосенсора (по С.Д. Варфоломееву, 1997)

Все виды биоселектирующих элементов можно комбинировать с различными трансдьюсерами и тем самым создавать большое разнообразие различных типов биосенсоров.

Основными характеристиками, позволяющими биосенсорному анализу успешно конкурировать с традиционными методами, являются оперативность анализа, высокая специфичность и чувствительность при низкой стоимости, отсутствие необходимости использовать дорогостоящую аппаратуру.

Наличие в устройстве биоматериала с уникальными свойствами позволяет с высокой селективностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси.

Разновидности биосенсоров и их применение. Разработка биосенсоров относится к наукоемким технологиям и представляет собой одну из ветвей современной биотехнологии. Существует несколько типов биосенсоров, среди которых наибольшее развитие получили ферментные и клеточные биосенсоры.

Ферментные биосенсоры могут быть представлены ферментными электродами, ферментными микрокалориметрическими датчиками, биодатчиками на основе хеми- и биолюминесценции.

Ферментные (или безреагентные) электроды — устройства основаны на применении электрохимического способа определения веществ, образующихся в ходе ферментативного превращения. Представляют собой электрод с нанесенным поверхностным слоем (каким-либо природным полимером), содержащим один или несколько иммобилизованных ферментов (иногда фермент может находиться в растворенном состоянии в приэлектродном слое, окруженном мембраной). В зависимости от типа взятого за основу электрода, устройства подразделяют на потенциометрические и амперометрические.

Ферментные микрокалориметрические датчики — устройства основаны на использовании теплового эффекта ферментативной реакции. Состоят из двух колонок (измерительной и контрольной), заполненных носителем с иммобилизованным ферментом и снаряженных термисторами. При пропускании через измерительную колонку анализи-

руемого образца происходит химическая реакция, которая сопровождается регистрируемым тепловым эффектом. Данный тип датчиков интересен своей универсальностью.

Хеми- и биолюминесцентные датчики — регистрируют световое излучение с различной длиной волны, испускаемое продуктами ферментативной реакции, находящимися в возбужденном состоянии. Конструкция включает колонку с иммобилизованными на носителе ферментами (люциферазой, пероксидазой) и светоприемное устройство. Заложенный в систему этого типа датчиков аналитический метод характеризуется прежде всего крайне высокой чувствительностью, позволяя определять фемтомольные (10^{-12} М) количества вещества.

Электроды, в которых применены иммобилизованные ферменты, во много раз долговечнее и позволяют провести несколько сот измерений, тогда как электроды, в которых используются естественные ферментные препараты, — только около 50.

В настоящее время наиболее распространен амперометрический биосенсор для определения сахара в крови (на основе иммобилизованной глюкозооксидазы). В качестве физического трансдьюсера в нем использован так называемый электрод Кларка. Исторически этот биосенсор является самым «древним».

Для контроля содержания пенициллина в питательной среде для выращивания бактерий используют пенициллиновый электрод — рН-датчик, покрытый иммобилизованным ферментом пенициллизой.

Биосенсоры, основанные на кислородном электроде как физическом трансдьюсере, позволяют определять разнообразные субстраты ферментов: лактаты, L-аминокислоты, салицилаты, оксалаты, пируваты, т. е. анионы соответствующих карбоновых кислот.

С помощью биосенсоров можно решать и обратную задачу: при некоторой определенной концентрации субстрата оценивать активность собственно фермента по величине измеряемого сигнала (потенциала, тока и т. д.). Из описания работы фермента следует, что измеряемый сигнал зависит не только от концентрации субстрата, но и от каталитиче-

ской активности биологического преобразователя, т. е. фермента. Такое применение биосенсоров позволяет измерить активность большого числа ферментов, например, в крови. Оценка активности ферментов, связанных с сердечной деятельностью (таких, как аспартаминотрансфераза, креатинкиназа), дает возможность в клинических условиях оценивать глубину инфаркта миокарда. Измерения активности фермента амилазы используют в педиатрии.

Клеточные биосенсоры. Одно из достижений биотехнологии связано с развитием методов включения живых клеток в полимеры и твердые носители различной природы и применением такого рода материалов для решения задач медицины и управляемого биосинтеза.

Методы иммобилизации клеток — физические и химические — сходны с методами иммобилизации отдельных ферментов. Стабильность иммобилизованных клеток определяется их метаболизмом, свойствами носителя и среды.

Наибольшее применение для иммобилизации нашли клетки микроорганизмов, которые легко культивируются, воспроизводятся и поддерживаются в чистой культуре, а также клетки растений, животных, человека. В отличие от ферментов, при их использовании не требуется дорогостоящих стадий очистки.

Имеющиеся методы позволяют получить клетки, сохраняющие около 100 % активности ферментов и способные функционировать достаточно длительные промежутки времени (в некоторых случаях такие клетки сохраняют жизнеспособность и активность ферментных систем в течение нескольких лет). Клетки, как правило, сохраняют все системы жизнеобеспечения, что позволяет проводить сложные последовательные реакции, осуществляя многостадийные процессы.

Для многих типов клеток, особенно микробных, разработаны эффективные методы генетических трансформаций, позволяющие получать мутанты с высоким содержанием того или иного белка или фермента, что дает возможность оперировать с высокоэффективными каталитическими системами. Клетки сохраняют аппарат биосинтеза белка. На основе этого могут быть разработаны высокоэффективные методы генодиагностики.

Основные недостатки клеточных биосенсоров заключаются в медленном отклике электрода (что связано с необходимостью использовать толстые мембраны), а также в сравнительно низкой селективности, обусловленной присутствием в клетке или тканях нескольких ферментных систем. В процессе роста и размножения интактные клетки разрушают носитель, а дочерние клетки загрязняют получаемый продукт. Эта проблема решается торможением роста, что достигается созданием дефицита фитогормонов для иммобилизованных клеток растений либо добавлением антибиотиков при применении клеток бактерий.

Для создания биосенсоров используют различные микроорганизмы: *Neigrospora europa* — для определения аммиака, *Trichosporon brassicae* — для определения уксусной кислоты, *Sarcina flava* — для определения глутамина, *Azotobacter vinelandii* — для определения нитратов и др. На основе гриба *Aspergillus niger* группой японских ученых созданы биосенсоры для определения биогенных аминов в мясных продуктах. В тканевых электродах нашли применение срезы почек и печени свиньи, желтой тыквы, банана и др.

Первоначально для иммобилизации клеток с сохранением их активности применяли материалы природного происхождения: желатин, агар, альгинат кальция, каррагинан. В последние годы разработаны и развиты методы включения живых клеток в синтетические полимерные гели.

В пищевой, фармацевтической, текстильной, металлургической, химической и других отраслях промышленности используется большое количество разнообразных химических соединений: органических кислот и их солей, аминокислот, витаминов и т. д. Эти вещества можно синтезировать как химическим, так и биотехнологическим способом. Причем биотехнологический синтез предпочтительнее для пищевой и фармакологической промышленности, так как в этом случае продукты получаются более чистыми и дешевыми.

Иммобилизованные клетки нашли применение в различных отраслях народного хозяйства для синтеза разнообразных химических соединений биотехнологическим способом (табл. 4).

Промышленное применение клеточных биосенсоров

Продукт биотехнологического процесса	Иммобилизованные клетки	Носители
Уксусная кислота	<i>Acetobacter aceti</i>	Древесная стружка, хлопок, керамика, стекло, DEAE-целлюлоза, включение в коллаген
Молочная кислота	<i>Lactobacillus delbruckii</i> , <i>Rhizopus orizae</i>	Са-альгинат, агароза, ПААГ, полые волокна, мембранные реакторы
Лимонная кислота	<i>Aspergillus niger</i>	Адсорбция на полипропиленовой пленке, включение в коллагеновую мембрану, ПААГ, гели Са-альгинат, агара
Аспарагиновая кислота	<i>Escherichia alcalescens</i> , <i>E. coli</i>	ПААГ, агар, агароза, каррагинан, полые волокна
Триптофан	<i>E. coli</i>	ПААГ
АТФ	<i>Sacharomyces sp.</i>	Поперечношитые смолы
Витамин В ₁₂	<i>Propionibacterium sp.</i>	Поперечношитые смолы, полиуретан, агар, каррагинан
6-Аминопенициллановая кислота	<i>E. coli</i>	Включение в ПААГ
Тетрациклин	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Полые волокна

Биосенсоры можно использовать также для:

- измерения пищевой ценности, свежести и безопасности продуктов питания;
- экспресс-анализа крови непосредственно у кровати больного;
- обнаружения и измерения степени загрязнения окружающей среды;

- детекции и определения количества взрывчатых веществ, токсинов и возможного биологического оружия;
- извлечения металлов из сточных вод;
- изготовления водородных солнечных элементов;
- очистки природных и сточных вод.

Распознавание определяемого вещества с помощью иммобилизованного биоматериала оказалось востребованным. Некоторые биосенсоры уже получают распространение для индивидуального применения в домашних аптечках (чаще всего для определения уровня сахара в крови). На очереди разработка конструкций биосенсоров, заменяющих рецепторы живых организмов, что позволит создать «искусственные органы» обоняния и вкуса, а также применять подобные разработки для возможно более точной и информативной диагностики ряда заболеваний.

7.5. Биочипы

Успехи в области развития молекулярной биологии и микроэлектроники подтолкнули разработчиков конструкций биосенсоров к новым решениям. Оказалось перспективным использовать так называемую планарную технологию (фотолитографию, полупроводниковую технику покрытий и т. д.) для изготовления **биочипа**, объединяющего сенсорную систему, трансдюсер, аналого-цифровой преобразователь и микропроцессор с целью измерения аналитического сигнала и расчета результатов анализа.

Прообразом современных биочипов послужил Саузерн-блотт, изготовленный в 1975 г. Э. Саузерном. Он использовал меченую нуклеиновую кислоту для определения специфической последовательности фрагментов ДНК, зафиксированных на твердой подложке. В России ученые начали активно разрабатывать биочипы только в конце 1980-х гг. в Институте молекулярной биологии РАН под руководством А.Д. Мирзабекова.

Технология микрочипов — это принципиально новый уровень лабораторных исследований, который позволяет проводить одновременное тестирование тысяч образцов. Тысячи

молекул ДНК или белков помещают на пластинки для создания соответственно ДНК-чипов или белковых чипов. Эти миниатюрные приборы используют для анализа специфических взаимодействий биологических макромолекул. Зондами в таких чипах могут служить олигонуклеотиды, фрагменты геномной ДНК, РНК, белки, рецепторы, лиганды и др.

За короткое время биочипы выделились в самостоятельную область анализа с приложениями — исследования фундаментальных проблем молекулярной биологии и молекулярной эволюции до практического применения в медицине, фармакологии, экологии, судебно-медицинской экспертизе и др.

Биочип и принцип его работы. Существует несколько разновидностей биочипов — матричные (с иммобилизованной ДНК), микрофлюидные (капиллярные) и биочипы с использованием микросфер с цветовой кодировкой.

У современных микрочипов размеры ячеек лежат в пределах 50–200 микрон; характерные объемы, относящиеся к отдельной ячейке, составляют примерно от 1 нл до 1 мкл; значения концентраций анализируемых макромолекул находятся обычно в пределах до 10 мкМ. Общее число ячеек на чипе составляет 10^3 – 10^5 , а его линейные размеры составляют приблизительно 1 см.

Микрозонды, которые должны взаимодействовать с образцом, наносят на подложку размером не больше почтовой марки. Каждый микрозонд имеет форму капельки, составляющей около 100 микрон в поперечнике. Все ячейки одного микрозонда одинаковы по размеру и располагаются с плотностью 10–30 «капелек» на 1 мм^2 . Чипы, на которых проходит ферментативная реакция, имеют более редкое расположение ячеек, чем чипы, на которых идет ДНК-реакция. Такая технология позволяет на одном биочипе разместить анализатор фактически всего генома человека — от 30 до 100 тыс. генов. При этом детектируется наличие участков ДНК длиной от шести до нескольких тысяч нуклеотидов — в зависимости от поставленной задачи.

Чаще всего для изготовления чипов служат пластинки из стекла, пластика, полупроводника или металла, на кото-

рые наносят биологические макромолекулы (ДНК, белки, ферменты), способные избирательно связывать вещества, содержащиеся в анализируемом растворе.

Во всех многопараметрических биочипах используют какой-либо механизм химического взаимодействия. Молекулы исследуемого образца соединяются со своей «парой» (микрозондом), помещенной в одну из нескольких тысяч ячеек на чипе. Например, нити ДНК соединяются со своей комплементарной парой, антиген — со своим антителом, субстрат — со своим ферментом. Наличие того или иного вещества или гена в образце определяют по люминесцентному свечению на прореагировавшем чипе. Флуоресценция является основным, но далеко не единственным методом изучения гибридизации. В частности, данные о характере гибридизации можно получить также с помощью масс-спектрометрии, атомной силовой микроскопии и др.

В зависимости от того, какие макромолекулы используются, выделяют различные виды биочипов, ориентированные на разные цели. В настоящее время преобладает производство ДНК-чипов (94 %), т. е. матриц, несущих молекулы ДНК. Оставшиеся 6 % составляют белковые чипы.

В основе принципа работы всех типов биочипов с иммобилизованной ДНК лежит точное соответствие между прямой и комплементарной ДНК по правилу Уотсона — Крика (А/Т или G/C). Гибридуемая ДНК обычно заранее нарабатывается в достаточных количествах с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Далее в ходе реакции на чипе происходит взаимодействие комплементарных цепей ДНК: одна из них с известной последовательностью нуклеотидов зафиксирована на пластине, а другая одноцепочечная ДНК-мишень, меченная флуоресцентной меткой, наносится на ДНК-чип.

Иммобилизуемая ДНК наносится на поверхность через игольчатые растры (пины) механического робота или с помощью технологии типа струйного принтера. Гибридуемая ДНК в растворе метится с помощью флуоресцентной или радиоактивной метки. Свойства флуоресцентного красителя не должны сильно зависеть от состава ДНК (А/Т или G/C) и температуры.

При взаимодействии биочипа с исследуемым образцом, предварительно обработанным светящимся (флуоресцентным) красителем, в соответствующих ячейках происходит химическая реакция, и тогда эти ячейки начинают светиться — тем сильнее, чем интенсивнее процесс. Анализ прореагировавших чипов производится автоматически с помощью анализатора (чип-детектора), который представляет собой широкопольный микроскоп, соединенный с видеокамерой и компьютером. По сути, именно в выявлении и сопоставлении наиболее ярко светящихся ячеек и заключается работа прибора — анализатора биочипов. Так определяются различные характеристики образца, например присутствие в организме тех или иных возбудителей инфекций или наличие в геноме каких-либо измененных генов.

В гелевых биочипах ДНК иммобилизуется в слое полиакриламидного геля толщиной 10–20 микрон, нанесенного на специально обработанную поверхность стекла. Иммобилизация осуществляется за счет образования ковалентных связей с помощью фотореакции при облучении ультрафиолетовым излучением. В гелевых биочипах взаимодействие между молекулами ДНК примерно такое же, как и в растворе. Кроме того, благодаря трехмерной конфигурации ячейки, в таких биочипах общее число иммобилизуемых молекул ДНК существенно выше, чем в поверхностных микрочипах, что приводит, соответственно, к более сильному сигналу флуоресценции из ячейки.

Особенностью российских гелевых биочипов является то, что такие гели удерживают большее количество пробы, нежели двухмерные, и потому чувствительность отечественных биочипов выше, а следовательно, ниже требования к регистрирующей аппаратуре. Немаловажно и то, что реакции в объемном геле протекают так же, как и в жидкостях, т. е. как в живом организме. Это позволяет получить результат, максимально приближенный к реальности.

На Западе исследователи пошли по другому пути и разработали для создания ДНК-чипов процесс фотолитографии, аналогичный процессу производства кремниевых процессоров. Например, Affimetrix (США) создал GeneChip

технологии, основанную на высокоплотных чипах, содержащих ДНК-последовательности.

ДНК-микрочипы применяют с целью практического использования информации, полученной в результате секвенирования геномов человека и других живых организмов, а именно для:

- идентификации мутаций в генах, связанных с различными заболеваниями;
- наблюдений за активностью генов;
- диагностики инфекционных заболеваний и определения наиболее эффективного метода терапии;
- идентификации генов, важных для продуктивности сельскохозяйственных культур;
- скрининга микроорганизмов, как патогенных, так и полезных, например используемых для восстановления загрязненных органическими отходами почв.

Чтобы использовать известные последовательности генов и геномных карт, необходимо определить функции входящих в их состав генов. Без *белковых микрочипов* эта работа очень трудоемка.

Белковые биочипы, несущие молекулы, «чувствительные» к различным низкомолекулярным соединениям, уже в скором будущем позволят определять наличие широкого спектра лекарственных веществ, гормонов, наркотиков, ядов, пестицидов практически в любом анализируемом материале (кровь, вода, пища или образец почвы), а также множество различных аллергенов, онкогенов, биологически активных веществ и даже генетических дефектов. Технология белковых биочипов заменит целые иммунологические лаборатории и даст возможность увеличить производительность большинства диагностических методов в тысячи раз, резко снизив себестоимость анализов.

Белковые микрочипы предполагается использовать для:

- обнаружения белковых биомаркеров, характерных для различных заболеваний и даже разных их стадий;
- оценки потенциальной эффективности и токсичности препаратов в доклинических испытаниях;
- измерения различий в синтезе белков отдельными типами клеток; клетками, находящимися на разных стадиях

развития; здоровыми и патологически измененными клетками;

— изучения взаимосвязи между структурой и функциями белков;

— оценки экспрессии белков с целью выявления мишеней для новых лекарственных препаратов;

— изучения взаимодействий между белками и другими молекулами.

Фундаментальный принцип, положенный в основу технологии микрочипов, вдохновил исследователей на создание большого числа устройств для решения широкого спектра научных задач и создания новых продуктов. Это тканевые и клеточные микрочипы, микрочипы на основе малых молекул.

Применение биочипов. Биочипы применяют как для исследовательских целей, так и в практической медицине. Они помогают в поиске и установлении функций различных генов. За короткий промежуток времени становится возможным проанализировать генетические мутации и выявить предрасположенность человека, например, к онкозаболеваниям (она выявляется у 60 % больных раком). В настоящее время в процессе сертификации находится биочип для диагностики лейкемии.

Поскольку существуют не только генные, но и белковые онкомаркеры (молекулы, сигнализирующие о раке), были разработаны и соответствующие биочипы. То же самое касается биозондов, определяющих совместимость при переливании крови, анализирующих организм пациентов на гепатит и СПИД.

Используя биочипы, можно диагностировать не только наследственные заболевания, но и болезни, являющиеся результатом прижизненных мутаций в генетическом коде.

Микрочипы помогают изучать молекулярные механизмы и осуществлять проверку действия различных лекарств, причем показания и противопоказания по применению препаратов можно выявлять на индивидуальном уровне.

Существенную помощь призваны оказать биочипы и при пересадке органов. Основная проблема при подобного рода операциях заключается в отторжении имплантированных

тканей иммунной системой человека. Маркерами, которые находятся в каждой человеческой клетке и служат для идентификации своих клеток, являются белки главного комплекса гистосовместимости. Для того чтобы избежать отторжения, необходимо, чтобы белки-маркеры на имплантированной ткани как можно меньше отличались от белков-маркеров пациента. Биочипы облегчат подбор наиболее подходящих доноров, пересадка органов от которых вызовет минимальный иммунный ответ.

Разрабатываются также биочипы для диагностирования различных форм туберкулеза. В настоящее время появилось множество разновидностей туберкулезной палочки, устойчивых к воздействию антибиотиков. Биочип позволит выявить все известные на сегодняшний день формы возбудителя туберкулеза, а также определить, каким именно антибиотиком нужно лечить конкретную форму заболевания. Причем вероятность выявления биочипом формы заболевания туберкулезом с устойчивыми к лекарствам возбудителями близка к 100 %. Диагностику можно будет провести в течение дня, тогда как другие традиционные методы требуют нескольких недель или даже месяцев.

Биочипы можно применять для контроля за некоторыми смертельно опасными бактериями (так, есть биочипы, позволяющие определять возбудителей сибирской язвы, оспы, чумы и бруцеллеза), а также для диагностики гриппа и определения его штаммов. Российские ученые получили грант Американского центра по контролю заболеваний (CDC) для совместной работы по выявлению штаммов вирусов гриппа.

Биочипы могут работать и дистанционно. Российские ученые предоставили свои технологии и оборудование в Университет Джорджа Вашингтона в Сиэтле, а также в американскую организацию Grand CRDF, которая работает с NASA. Последний проект касается возможности обнаружения жизни вне Земли, что связано с необходимостью многопараметрического анализа с помощью автономной системы с использованием биочипов.

Приведенные примеры свидетельствуют в пользу того, что в ближайшее время технология биочипов будет стремительно развиваться, а их массовое производство приведет к

резкому уменьшению стоимости этой продукции. Сейчас число размещаемых на биочипе ячеек достигает уже нескольких тысяч, что соответствует тысячам пробирок с проводимыми в них анализами. Такие биочипы представляют собой целые экспресс-лаборатории, которые позволяют сэкономить массу времени как врачам, так и пациентам. Развитие технологии использования биочипов не только приведет к резкому сокращению сроков проведения анализов, но и даст возможность осуществлять диагностику на индивидуальном уровне.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие соединения являются основой энзиматической инженерии?
2. Расскажите о ферментах. Перечислите области их применения.
3. Приведите примеры использования ферментов для лечения и диагностики заболеваний.
4. В чем заключаются недостатки препаратов чистых ферментов?
5. Что такое иммобилизованные ферменты?
6. Как получают иммобилизованные ферменты?
7. В чем состоят преимущества иммобилизованных ферментов, по сравнению со свободными ферментативными препаратами?
8. Кто впервые открыл способ сохранения активности выделенного из клетки фермента?
9. Какими свойствами должны обладать носители, используемые для иммобилизации ферментов?
10. В чем сущность физических методов иммобилизации?
11. Дайте краткую характеристику химических методов иммобилизации.
12. Какими соединениями представлены природные полимерные носители?
13. Расскажите о синтетических полимерных носителях.
14. Какие методы применяются для иммобилизации ферментов?
15. Как используются ферменты для очистки загрязнений внешней среды?
16. В каких отраслях народного хозяйства применяются иммобилизованные ферменты?
17. Расскажите об иммобилизованных полиферментных системах.
18. Когда была создана первая искусственная биферментная система и какие компоненты она включала?

19. В каких случаях желательно использование иммобилизованных полиферментных систем?
20. Что такое биосенсоры?
21. Какие соединения являются биоматериалом для получения биосенсоров?
22. Расскажите о принципах конструирования биосенсоров.
23. Какие типы биосенсоров наиболее широко применяются в народном хозяйстве?
24. Какие виды микроорганизмов используются для создания биосенсоров?
25. Что такое биочип и для чего он предназначен?
26. Перечислите и охарактеризуйте разновидности биочипов.
27. В каких случаях применяют ДНК-микрочипы?

Глава 8

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Экологическая биотехнология основана на использовании живых организмов при переработке опасных отходов и борьбе с загрязнением окружающей среды. Эти методы обеспечивают более эффективное, по сравнению с традиционными подходами, обезвреживание, а также значительно снижают нашу зависимость от утилизации мусора путем сжигания и создания хранилищ токсичных отходов.

Использование биотехнологии для решения экологических проблем не новая идея. Уже более ста лет смешанные бактериальные популяции применяют для очистки сточных вод. Для поддержания жизни все живые организмы (животные, растения, бактерии и др.) поглощают и переваривают питательные вещества и выделяют в окружающую среду образующиеся при этом продукты жизнедеятельности.

8.1. Биотехнология утилизации твердых отходов

Твердые отходы, являющиеся продуктами жизнедеятельности человека, складывают на городских свалках. Их число в настоящее время огромно. Увеличиваются не только площади свалок, но и неуправляемое попадание отходов в окружающую среду, в частности за счет рассыпания при транспортировке.

Несмотря на все возрастающий интерес к повторному использованию сырья, очевидно, что простая ликвидация отходов на свалках существенно дешевле любого способа их переработки. Когда же стало ясно, что при анаэробной переработке отходов образуется в больших количествах ценный энергетический носитель — биогаз, основные усилия стали направляться на соответствующую организацию свалок и получение на месте их переработки метана (рис. 8.1).

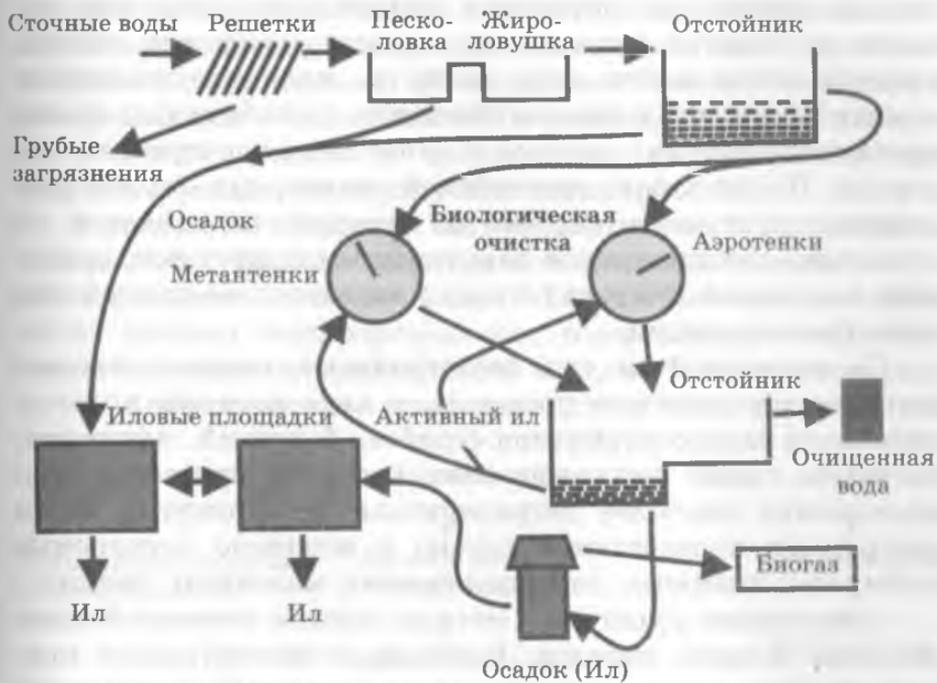


Рис. 8.1. Схема гидромеханической очистки воды

Состав отходов, вывозимых на городские свалки, становится все более однотипным: увеличивается объем бумаги и пластмасс на фоне снижения доли органических и растительных отходов. Исследования химического состава содержимого свалок показали, что фракция, поддающаяся биодеградации, составляет до 70 % от общего количества твердых отходов.

На свалке постоянно происходит наслаивание нового материала через различные временные промежутки. В результате меняются температура, значения рН, потоки жидкости, ферментативная активность микроорганизмов и т. п., что негативно сказывается на переработке отходов.

В общей массе материала свалок присутствует сложная ассоциация микроорганизмов, которые развиваются на поверхности твердых частиц и служат для них источником биогенных элементов. Внутри ассоциации складываются разнообразные взаимосвязи и взаимодействия. Состояние и

биокаталитический потенциал микробного сообщества зависят от спектра химических веществ материала свалок, степени доступности этих веществ, наличия градиентов концентраций различных субстратов, в особенности градиентов концентраций доноров и акцепторов электронов и водорода. На типичной европейской свалке, где отходы размещены по отсекам, система их переработки является, по существу, совокупностью реакторов периодического действия, в которых субстрат (отходы) находится на разных стадиях биодеградации.

На начальной стадии биодеградации твердых отходов доминируют аэробные процессы, в ходе которых под воздействием микроорганизмов (грибов, бактерий, актиномицетов), а также беспозвоночных (клещей, нематод и др.) окисляются наиболее деградируемые компоненты. Затем деструкции подвергаются трудно и медленно окисляемые субстраты: лигнины, лигноцеллюлозы, меланины, танины.

Существуют различные методы оценки степени биодеградации твердых отходов. Наиболее информативным принято считать метод, основанный на различиях в скоростях разложения целлюлозы и лигнина. В непереработанных отходах отношение содержания целлюлозы к лигнину составляет около 4,0; в активно перерабатываемых — 0,9–1,2 и в полностью стабилизированных — 0,2.

В течение аэробной стадии температура среды может повышаться до 80 °С, что вызывает инактивацию и гибель патогенной микрофлоры, вирусов, личинок насекомых. Повышение температуры увеличивает скорость протекания процессов деструкции органических веществ, но при этом снижается растворимость кислорода, что является лимитирующим фактором. Исчерпание молекулярного кислорода *in situ* приводит к снижению тепловыделения и накоплению углекислоты. Это, в свою очередь, стимулирует развитие в микробной ассоциации сначала факультативных, а затем облигатных анаэробов.

В анаэробной минерализации, в отличие от аэробного процесса, участвуют разнообразные микроорганизмы, взаимодействующие между собой. При этом виды, способные использовать более окисленные акцепторы электронов, по-

лучают термодинамические и кинетические преимущества. Происходит процесс гидролиза полимеров типа полисахаридов, липидов, белков; образованные при этом мономеры расщепляются с образованием водорода, диоксида углерода, а также спиртов и органических кислот; затем при участии метаногенов образуется метан (рис. 8.2).

В результате процессов, происходящих при биодegradации содержимого свалок, формируется два типа продуктов — фильтрующиеся в почву воды и биогазы. *Фильтрующиеся воды*, помимо микроорганизмов, содержат разнообразные вещества, включая аммонийный азот, летучие жирные кислоты, алифатические, ароматические и ациклические со-

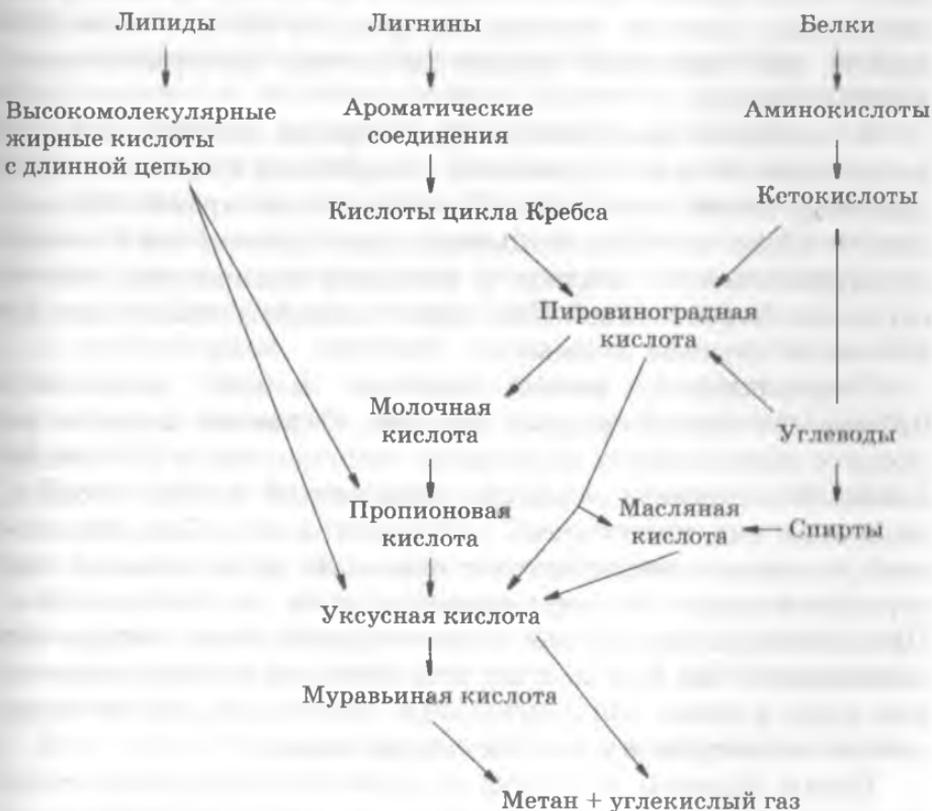


Рис. 8.2. Биохимическое расщепление отдельных соединений до метана и углекислого газа при анаэробном расщеплении отходов (по И. Хиггинсу и др., 1988)

единения, терпены, минеральные макро- и микроэлементы, металлы. Поэтому важным условием при выборе и организации мест свалок является защита поверхности земли и грунтовых вод от загрязнений. Для борьбы с фильтрацией вод применяют малопроницаемые засыпки, создают непроницаемые оболочки вокруг свалки или специальные заграждения.

При биодеградации материала свалок образуется *биогаз* — ценный энергоноситель, который также может вызывать негативные явления в окружающей среде (дурной запах, закисление грунтовых вод, снижение урожайности сельскохозяйственных культур). Ограничить утечку биогаза помогают специальные приспособления (преграды; траншеи, наполненные гравием; системы экстракции газа), а также создание над массивом свалок оболочек, препятствующих этому процессу.

В последние десятилетия существенно возрос интерес к извлечению метана в процессах переработки свалок. В США для этих целей построено 10 установок, в странах Евросоюза — около 40. Сбор и последующее применение биогаза, образующегося на свалках в больших количествах, имеет огромные перспективы. Так, одна установка может дать до 40 тыс. м³ биогаза в день.

Теоретический выход метана может составлять 0,266 м³/кг сухих твердых отходов. Огромное влияние на процесс метаногенеза оказывают температура и рН среды, влажность, уровень аэрации, химический состав отходов, наличие в них токсических компонентов и др. Газ, образуемый на свалке, извлекается с помощью вертикальных или горизонтальных перфорированных труб из полиэтилена. Применение воздуходувок и насосов повышает степень его извлечения. Газ используют для обогрева теплиц, получения пара, а после дополнительной очистки его можно перекачивать по трубам к местам потребления.

Таким образом, проблема анаэробной переработки твердых отходов, помимо экологического, носит и экономический характер, так как использование образуемого на свалках биогаза снижает материальные затраты на борьбу с загрязнениями, опасными и дурнопахнущими отходами.

8.2. Биотехнология очистки сточных вод

Использование и получение огромного количества продуктов в различных сферах человеческой деятельности сопровождается образованием сточных вод, загрязненных разнообразными органическими и неорганическими соединениями. Многие из них токсичны для живых организмов. Сброс неочищенных сточных вод отрицательно сказывается на содержании в воде растворенного кислорода, ее pH, прозрачности и цветности и т. д., что отрицательно влияет на состояние компонентов водной экосистемы, снижает продуктивность и способность водоемов к самоочищению.

Сточные воды могут быть классифицированы по *источнику происхождения*:

— **производственные (промышленные) сточные воды**, образующиеся в технологических процессах при производстве или добыче полезных ископаемых. Отводятся через систему промышленной или общесплавной канализации;

— **бытовые (хозяйственно-фекальные) сточные воды**, образующиеся в жилых помещениях, а также в бытовых помещениях на производстве. Отводятся через систему хозяйственно-бытовой или общесплавной канализации;

— **атмосферные сточные воды** (их подразделяют на дождевые и талые, т. е. образующиеся при таянии снега, льда, града). Отводятся, как правило, через систему ливневой канализации.

Производственные сточные воды, в отличие от бытовых и атмосферных, не имеют постоянного состава и, в свою очередь, могут быть классифицированы:

1) по *составу загрязнителей* — на загрязненные: преимущественно минеральными примесями; органическими примесями; как минеральными, так и органическими примесями;

2) по *концентрации загрязняющих веществ* — с содержанием примесей:

- 1–500 мг/л;
- 500–5000 мг/л;
- 5000–30 000 мг/л;
- более 30 000 мг/л;

3) по свойствам загрязнителей:

по кислотности на:

— неагрессивные (рН 6,5–8);

— слабоагрессивные (слабощелочные — рН 8–9 и слабокислые — рН 6–6,5);

— сильноагрессивные (сильнощелочные — рН > 9 и сильнокислые — рН < 6);

по токсическому воздействию и воздействию загрязнителей на водные объекты — на содержащие вещества:

— влияющие на общесанитарное состояние водоема (например, на скорость процессов самоочищения);

— изменяющие органолептические свойства (вкус, запах и др.);

— токсичные для человека и обитающих в водоемах животных и растений.

Специальные «Правила охраны поверхностных вод от загрязнений сточными водами» нормируют показатели загрязнения в водоеме после смешивания сточных вод с естественными. Важнейшими являются следующие показатели:

— количество растворенного в воде кислорода после смешивания — не менее 4 мг/л;

— содержание взвешенных частиц после спуска стоков не может возрасти более чем на 0,25–0,75 мг/л (для водоемов разной категории);

— содержание минерального осадка — не более 1000 мг/л;

— органолептические свойства — вода не должна иметь запахов и привкусов;

— рН — в пределах 6,5–8,5.

Кроме того, на поверхности не должно быть пленок, плавающих пятен, а содержание ядовитых веществ не должно превышать установленных предельно допустимых концентраций (ПДК). Запрещается сбрасывать в водоемы радиоактивные вещества.

Известно, что попавшие в водоемы органические вещества окисляются до CO_2 и H_2O в пределах способности водоемов к самоочищению, а количество кислорода, расходуемое в этих процессах, т. е. БПК (биохимическое потребление кислорода), определяется концентрацией и спектром

присутствующих в воде примесей. Показатель БПК является важным критерием при оценке состояния сточных вод. Различают БПК₅ (пятидневный), БПК₂₀ (двадцатидневный) и БПК_{полн} (полный). БПК_{полн} обозначает время, в течение которого все вещества стоков окисляются в водоеме полностью до конечных продуктов.

Комплекс мероприятий по удалению загрязнений, содержащихся в бытовых и промышленных сточных водах, называется **очисткой сточных вод**. Это система методов, вызывающих разрушение или удаление из них присутствующих веществ, а также патогенных микроорганизмов. Очистка сточных вод включает три этапа: механический, биологический и физико-химический. Иногда производят дезинфекцию сточных вод.

На *механическом этапе* осуществляют предварительную очистку сточных вод. Он необходим для подготовки поступающих на очистные сооружения сточных вод к дальнейшим этапам очистки.

Для вылавливания крупных загрязнений применяют решетки и сита. Затем стоки проходят через песколовки, где осаждаются мелкие частицы (песок, молотый кофе и т. п.) и жироловушки, в которых происходит удаление с поверхности воды гидрофобных веществ. Песок из песколовок обычно складывают или применяют в дорожных работах. Очищенные таким образом сточные воды переходят на первичные отстойники для выделения взвесей. В результате удаляется до 60–70 % минеральных загрязнений, а БПК₅ снижается на 30 %.

Механический этап очистки важен для создания равномерного движения сточных вод и позволяет избежать колебаний объема стоков на биологическом этапе.

Биологический этап (биологическая очистка) предполагает деграцию органической составляющей сточных вод микроорганизмами (бактериями и простейшими), которые используют в качестве ростовых субстратов различные соединения, входящие в их состав. При этом происходят минерализация вод, удаление органического азота и фосфора, а главной целью является снижение БПК₅.

В процессах биологической очистки принимает участие сложная биологическая ассоциация, состоящая из бакте-

рий, водных грибов, простейших организмов (амебы, жгутиковые и ресничные инфузории), микроскопических животных (коловратки, круглые черви — нематоды, водные клещи) и др. В сточных водах часто встречаются следующие виды микроорганизмов: эуглифа (раковинная амеба), аэрцелла (раковинная амеба), инфузория туфелька, хармонихилл (инфузория), стилонихия (инфузория), циклидиум (инфузория), кархезиум (колониальная инфузория), оперкулярия (колониальная инфузория), оксидриха (брюхоресничная инфузория), эплотес (брюхоресничная инфузория), сосущая инфузория, амеба протей, амеба дисковидная, амеба террикола, нитчатые бактерии, политома (жгутиковые), бодо (жгутиковые), коловратка нотоммата, коловратка филодина, коловратка мостила, коловратка катипна, аспидиска (брюхоресничная), аэлозома (малоресничный червь).

Достоинства биологической очистки заключаются в возможности удаления из стоков широкого спектра органических и неорганических веществ, простоте используемой аппаратуры и относительно невысоких эксплуатационных расходах. На этом этапе необходимо строго соблюдать технологии режима очистки и, главное, учитывать чувствительность микроорганизмов к высоким концентрациям загрязнителей. Поэтому перед биоочисткой стоки необходимо разбавлять.

На этом этапе очистки сточных вод можно применять как аэробные микроорганизмы, которые используют для окисления веществ кислород, так и анаэробные микроорганизмы, не имеющие доступа ни к свободному растворенному кислороду, ни к предпочтительным акцепторам электронов типа нитрат-ионов. В этих процессах в качестве акцептора электронов микроорганизмы могут использовать углерод.

При выборе между аэробными и анаэробными процессами предпочтение обычно отдают первым: аэробные системы более надежны, стабильно функционируют и больше изучены.

Биологическая очистка стоков проводится в различных по конструкции сооружениях — биофильтрах, аэротенках (с активным илом) и метантенках (анаэробное брожение).

Аэробные процессы очистки стоков. *Биофильтр* — наиболее распространенный тип биореактора с неподвижной биопленкой, применяемый для очистки стоков. По су-

ществу, это реактор с неподвижным слоем и противотоком воздуха и жидкости. Биомасса растет на поверхности насадки в виде пленки. Особенности насадки или фильтрующего слоя являются значительная удельная поверхность для развития микроорганизмов и большая пористость. Последнее придает необходимые газодинамические свойства слою и способствует прохождению через него воздуха и жидкости.

В биофилтре происходят непрерывный прирост и отмирание биопленки. Отмершая биопленка смывается током очищаемой воды и выносится из биофилтра. Очищенная вода поступает в отстойник, в котором освобождается от частиц биопленки, и далее сбрасывается в водоем. Процесс окисления органических веществ сопровождается выделением тепла, которое используется для обогрева биофилтра.

Эксплуатация биофилтров достаточно несложный процесс. Важное условие их эффективной работы — тщательная предварительная очистка стоков от взвешенных частиц, способных засорить распределительное устройство. Неблагоприятными факторами при эксплуатации биофилтров являются вероятность их переполнения, размножение мух на поверхности, дурной запах как следствие избыточного образования микробной биомассы.

Около 70 % очистных сооружений Европы и Америки представляют собой капельные биофилтры. Срок службы таких биореакторов исчисляется десятками лет (до 50). Основной недостаток конструкции — избыточный рост микробной биомассы, что приводит к засорению биофилтра и вызывает сбой в системе очистки.

Аэротенк относится к гомогенным биореакторам. Типовая конструкция биореактора представляет собой железобетонный герметичный сосуд прямоугольного сечения, связанный с отстойником. Подача воздуха в «коридоры» аэротенка осуществляется через пористые железобетонные плиты или через систему пористых керамических труб. Обычно воздухораспределительное устройство располагают не по центру, а около одной из стен коридора. В результате этого в аэротенке происходит турбулизация потока, и сточные воды не только продвигаются вдоль коридора, но и за-

кручиваются по спирали внутри него. Это улучшает режим аэрации и условия очистки.

В аэротенке происходит непрерывная ферментация. Частицы активного ила, образованные бактериями и простейшими, являются флокулирующей смесью. По сравнению с биопленкой, функционирующей в биофильтрах, в активном иле аэротенков беднее экологическое разнообразие видов.

Биоочистка в аэротенке осуществляется в два этапа. На первом этапе микроорганизмы активного ила адсорбируют загрязняющие вещества стоков, на втором — окисляют их и восстанавливают свою окислительную способность.

Число микроорганизмов в активном иле достигает многих миллиардов бактериальных клеток в 1 г ила. Количество бактерий, как и их видовой состав, может быстро меняться, в зависимости от химического состава поступающей в данный момент воды.

Среди обитателей активного ила больше всего псевдомонад (*Pseudomonas*) — свыше половины всех видов; представители родов *Bacillus* составляют более трети всех видов, *Enterobacterium* и *Sarcinia* — около одной пятой. Есть еще сахаромицеты (*Sacharomycetes*, до 8–10 %), микрококки (*Micrococcus*), разные грибки, актиномицеты и близкие к ним микобактерии, немного нитчатых бактерий *Sphaerotilis natans* и *Cladotrix dichotoma*. Если в воде есть соединения серы, то в активном иле появляются серобактерии и тионовые бактерии (*Thiobacillus thioparus*), которые усваивают серу. Серобактерии (бесцветная серобактерия *Beggiata alba* или пурпурная, с красным пигментом, из семейства *Thiorodacea*) образуют обрастания или плавающие нити.

Микроорганизмы формируют скопления в виде слизи — зооглеи, в которой много палочковидных бактерий, кокков. Обычный обитатель активного ила *Zoogloea ramigera* образует зооглеи в виде лопастей. Все эти группы микробов осуществляют первичное окисление и разложение жиров и углеводов и усваивают продукты их распада. При этом образуются промежуточные вещества: спирты, органические кислоты.

В качестве самостоятельного очистного сооружения или конечного пункта очистки стоков, прошедших стадию биоочистки в биофильтре или аэротенке, используют биологи-

ческие (очистные) пруды. Если таковые функционируют как самостоятельные системы водоочистки, сточные воды перед поступлением в них разбавляются трех-, пятикратными объемами технической или хозяйственно-питьевой воды. Для отстаивания стоков без разбавления нагрузка на пруды составляет до $250 \text{ м}^3/\text{га}/\text{сут.}$, для биологически очищенных вод — до $500 \text{ м}^3/\text{га}/\text{сут.}$ Средняя глубина прудов составляет от 0,5 до 1,0 м. Срок «созревания» прудов в зонах умеренного климата — не менее одного месяца.

Методы аэробной биологической очистки сточных вод непрерывно совершенствуются. В последние годы стали внедряться более эффективные системы биоочистки, например *шахтные реакторы*, с использованием для аэрирования кислорода. Такие биореакторы называют *окситенками*. Концентрация растворенного в них кислорода достигает 10–12 мг/л, что в несколько раз превосходит уровень аэрации в аэротенках. В результате повышенной аэрации стоков концентрация активного ила в них возрастает до 15 г/л и их окислительная мощность в четыре-пять раз превосходит аэротенки.

Шахтные биореакторы позволяют реализовать процесс очистки стоков аналогично протеканию его в окислительном канале, но расположенном вертикально. Такие реакторы занимают небольшие площади и большей частью заглублены в грунт. Высота шахтных аппаратов достигает 50–150 м при диаметре 0,5–10,0 м. Внутри аппарата вмонтирован полый стержень или специальное устройство, обеспечивающее образование зон восходящего и нисходящего потоков для циркуляции очищаемой воды.

Однако при эксплуатации окситенков возникает проблема отделения твердых частиц от иловой смеси: микропузырьки воздуха прилипают к твердым частицам и ухудшают осаждение. Для улучшения осаждения применяют вакуумную дегазацию, флотацию, отдувку воздуха. По завершении стадии дегазации иловая смесь направляется в аэротенк, где после удаления микропузырьков происходит доокисление оставшейся органики. Далее стоки поступают по обычной схеме в отстойник.

Анаэробные процессы очистки стоков. Анаэробные процессы очистки сточных вод не получили достаточно ши-

рокого развития. Они существенно уступают аэробным процессам в скорости очистки, хотя имеют ряд преимуществ:

- масса образуемого в них активного ила практически на порядок ниже (0,1–0,2), по сравнению с аэробными процессами (1,0–1,5 кг/кг удаленного ВПК);
- существенно ниже энергозатраты на перемешивание;
- дополнительно образуется энергоноситель в виде биогаза.

Вместе с тем анаэробные процессы очистки мало изучены, и для них требуются дорогостоящие очистные сооружения больших объемов.

Анаэробные процессы для очистки стоков применяются в Европе около 100 лет. Используемые для этих целей био реакторы — *септиктенки* и *метантенки* — представляют собой отстойники, в которых осадок ила подвергается анаэробной деградации.

Например, в первичном отстойнике остался избыточный осадок ила, содержащий недоокисленные вещества. Этот осадок плохо сохнет, содержит много болезнетворных микробов, имеет неприятный запах, привлекает мух. Его направляют на сбраживание в бескислородных условиях в специальные резервуары — метантенки, где развиваются анаэробные микроорганизмы, функционирующие при температуре от 23 до 55 °С.

В процессах метанового сбраживания с образованием газа метана участвуют микроорганизмы родов *Methanococcus* и *Methanobacterium*. Разные виды клостридий (*Clostridium*) разлагают целлюлозу, пектины, жиры. Очищение осадка в метантенках может длиться от 6 до 15 суток. За это время погибают яйца гельминтов (например, болезнетворные микроорганизмы), остаются единичные особи кишечной палочки *Escherichia coli*, а общее количество бактерий составляет не более 100 клеток в 1 мл. Высушенный осадок недоокисленных примесей содержит до 20 микроэлементов и служит неплохим удобрением.

Анаэробные проточные сбраживатели такого типа применяют для анаэробной биоочистки промышленных и сельскохозяйственных стоков.

Особенно эффективно применение сравнительно недорогих анаэробных систем для сильно загрязненных стоков пищевой промышленности и отходов интенсивного животноводства, которые имеют высокие уровни нагрузки по БПК и ХПК (химическая потребность в кислороде), а навозные стоки — также и высокое содержание нерастворимых компонентов, не поддающихся биodeградации. Для их очистки применяют сбразиватели полного смешения. Стоки свино- и птицекомплексов освобождаются в ходе анаэробной биоочистки только на 50 % ХПК, а стоки ферм крупного рогатого скота — на 30 %. Высокие концентрации органики и аммонийного азота (до 4000 мг/л) способны ингибировать процесс деградации.

В целом же анаэробные процессы очистки стоков, обладая рядом несомненных достоинств, не находят пока такого широкого применения, как аэробные системы биоочистки. Однако в последние годы, вследствие более строгих требований к предварительной очистке промышленных стоков перед сбросом их в канализацию, интерес к анаэробным процессам возрастает.

Физико-химический этап очистки стоков. Главная цель водоочистки — производство бактериально безопасной воды. Для улучшения параметров очистки применяют различные химические методы, например дополнительное осаждение фосфора солями Fe и Al, хлорирование, озонирование.

Наиболее распространенным способом дезинфекции воды является ввод в нее хлора — сильного окислителя, который добавляется к воде в виде газа или концентрированного водного раствора. Эффективность обработки хлором зависит от ряда факторов, в том числе от pH, времени обработки, температуры и наличия взаимодействующих с хлором органических веществ. Небольшое количество свободного хлора оставляют в воде на случай попадания загрязнений в потребительскую водопроводную сеть. Поскольку при бытовом использовании воды в водосток сбрасывается много колиформных бактерий, их обнаружение служит показателем бытового загрязнения (коли-индекс).

8.3. Биоочистка газовоздушных выбросов

В условиях возрастающей технологической деятельности все большую остроту приобретает проблема борьбы с загрязнением воздушного бассейна. Основными загрязнителями атмосферы являются предприятия нефтеперерабатывающей, химической, пищевой и перерабатывающей промышленности, а также большие сельскохозяйственные комплексы, отстойники сточных вод, установки по обезвреживанию отходов. В воздухе крупных промышленных городов содержится огромное количество вредных веществ, а концентрация многих токсикантов превышает допустимые уровни. Это органические (ароматические и непредельные углеводороды, азот-, кислород-, серо- и галогенсодержащие соединения) и неорганические вещества (сернистый газ, сероуглерод, окислы углерода, аммиак, хлор, водород, галогены). В воздушных бассейнах больших промышленных городов присутствуют десятки различных соединений, в том числе дурнопахнущие, способные даже в незначительных концентрациях представлять угрозу для здоровья, а также вызывать у людей чувство дискомфорта.

Существуют различные методы очистки воздуха — физические, химические и биологические, однако уровень и масштабы их применения в настоящее время не столь широки.

Физические методы — это абсорбция примесей на активированном угле и других поглотителях, абсорбция жидкостями.

Химические методы — это озонирование, прокаливание, каталитическое дожигание и хлорирование воздуха.

Биологические методы очистки газовоздушных выбросов начали применять сравнительно недавно и пока в ограниченных масштабах. Они базируются на способности микроорганизмов разрушать в аэробных условиях широкий спектр веществ и соединений до конечных продуктов — CO_2 и H_2O . Широко известна способность микроорганизмов метаболизировать алифатические, ароматические, гетероциклические, ациклические и различные Cl-соединения. Микроорганизмы утилизируют аммиак, окисляют сернистый газ, сероводород и диметилсульфоксид. Образующие сульфаты утилизируются другими микробными видами.

Есть данные об эффективном окислении аэробными карбоксидобактериями монооксида углерода — одного из наиболее опасных воздушных загрязнителей. Представители рода *Nocardia* эффективно разрушают стерин и ксилон, *Hyphomicrobium* — дихлорэтан, *Xanthobacterium* — этан и дихлорэтан, *Mycobacterium* — винил-хлорид.

Наиболее широким спектром катаболических путей характеризуются почвенные микроорганизмы. Так, только представители рода *Pseudomonas* способны использовать в качестве единственного источника углерода, серы или азота свыше 100 соединений — загрязнителей биосферы. Микробиология и генетика располагают большими возможностями для повышения биосинтетического потенциала микроорганизмов—деструкторов токсичных веществ, включая методы традиционной селекции и отбора, а также новейшие достижения клеточной и генетической инженерии. Подавляющее число токсических загрязнителей атмосферы может быть разрушено монокультурами микроорганизмов, но эффективнее применять смешанные культуры, имеющие большой каталитический потенциал, а следовательно, большую деструктурирующую способность. Для разрушения трудноутилизуемых соединений в ряде случаев микроорганизмы целесообразно адаптировать к таким субстратам и только после этого вводить их в рабочее тело действующих установок.

Для биологической очистки воздуха применяют три типа установок: биофильтры, биоскрубберы и биореакторы с омываемым слоем.

Принципиальная схема для биологической очистки воздуха впервые была предложена в 1940 г. Г. Прюссом. Первый биофильтр в Европе был построен в 1980 г. в Германии (ФРГ), а уже в 1984 г. в этой стране функционировало или находилось в стадии запуска около 240 установок.

Основным элементом *биофильтра для очистки воздуха*, как и водоочистного биофильтра, является фильтрующий слой, который сорбирует токсические вещества из воздуха. Далее эти вещества в растворенном виде диффундируют к микробным клеткам, включаются в них и подвергаются деструкции.

В качестве носителя для фильтрующего слоя используют природные материалы — компост, торф и др. Эти материалы содержат в своем составе различные минеральные соли и вещества, необходимые для развития микроорганизмов. Поэтому в биофильтры не вносят каких-либо минеральных добавок. Воздух, подлежащий очистке, подается вентилятором в систему, проходит через фильтрующий слой в любом направлении (снизу вверх или наоборот). При этом воздух должен проходить через всю массу фильтрующего слоя равномерно, для чего требуются однородность слоя и определенная степень влажности. Оптимальная для очистки воздуха влажность фильтрующего слоя составляет 40–60 % от веса материала носителя. При недостаточной влажности материала фильтрующего слоя в нем образуются трещины, материал пересыхает. Это затрудняет прохождение воздуха и снижает физиологическую активность микроорганизмов. Увлажнение материала обеспечивается распылением воды на поверхности фильтрующего слоя. При избыточной влажности в толще слоя происходит образование анаэробных зон с высоким аэродинамическим сопротивлением. В результате снижается время контакта потока воздуха с поглотителем, падает эффективность очистки. В толще фильтрующей массы не должно образовываться более плотных зон или комков материала, что бывает при использовании компоста, так как при этом снижается удельная площадь поверхности фильтрующего слоя. В материале фильтрующего слоя не должно возникать температурных градиентов и не должно происходить резких изменений рН среды. Поэтому температурный режим в биофильтре поддерживается постоянным. Для этого воздух, подаваемый в биофильтр, подогревается, установка в целом термостатируется.

Для обеспечения стабильной работы биофильтров следует соблюдать комплекс мер, важнейшими из которых являются следующие. Воздух, подаваемый на очистку в биофильтр, предварительно увлажняют в биоскруббере до относительной влажности в 95–100 %. При заполнении фильтрующего слоя для снижения аэродинамического сопротивления в материал добавляют гранулы (диаметром 3–10 мм) из синтетических полимерных материалов (полиэтилена, полистирола), а также частицы автопокрышек, акти-

нированный уголь. Масса добавок составляет от 30 до 70 % от массы фильтрующего материала. С целью предотвращения резкого закисления материала фильтрующего слоя в ходе трансформации органики в него добавляют известняк или карбонат кальция в количестве 2–40 % от веса носителя. Чтобы избежать ситуаций, когда микроорганизмы, входящие в состав рабочего тела биофильтра, могут ингибироваться токсическими веществами (в результате, например, залповых выбросов), в материал вносят активированный уголь — до 250 кг/м³.

Эффективность работы биофильтра определяется газодинамическими параметрами фильтрующего слоя, спектром и концентрацией присутствующих в воздухе веществ, ферментативной активностью микроорганизмов-деструкторов. При этом скорость удаления вредных примесей из воздуха в процессе биоочистки может лимитироваться как диффузией веществ из газовой фазы в биокаталитический слой, так и скоростью протекания биохимических реакций в микробных клетках. При высокой входной концентрации вредных веществ в воздухе процесс их деструкции в ходе прохождения потока через фильтрующий слой неравномерен. Сначала разрушаются легкодоступные вещества, и только в конце процесса начинается разрушение труднодеградируемых соединений. Так, в случае присутствия в воздухе в качестве вредных примесей комплекса соединений: бутанола, этилацетата, бутилацетата и толуола — последний утилизируется микроорганизмами только после окисления всех остальных веществ.

Стационарное состояние и наиболее высокая скорость биоочистки наступают спустя некоторое время после запуска биофильтра, поскольку необходим некоторый период для созревания и адаптации микробиологического ценоза. Длительность периода адаптации зависит от концентрации веществ в воздухе и микробного состава в диффузионном слое и может составлять от нескольких часов до нескольких недель. Иногда концентрация микроорганизмов в ходе очистки возрастает и может стать избыточной. Поэтому периодически материал фильтрующего слоя приходится обновлять. Длительность циклов достаточно велика и составляет несколько лет.

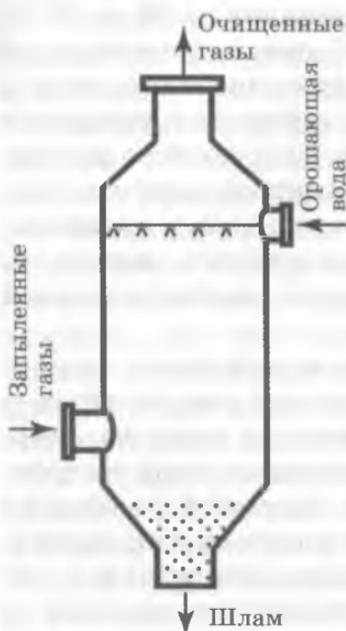


Рис. 8.3. Схема биоскрубера

Принцип функционирования *биоскрубера* (рис. 8.3) отличается тем, что процесс очистки воздуха реализуется в две стадии и в двух различных установках. На первом этапе (в абсорбере) поглощаются токсические вещества, находящиеся в воздухе, а также кислород, который растворяется в воде. В результате воздух выходит очищенным, а загрязненная вода далее следует на очистку. Применяют различные типы абсорберов (барботажные, насадочные, распылительные, форсуночные и т. д.). Цель конструктивных усовершенствований заключается в увеличении площади поверхности раздела фаз газа и жидкости. Это определяет эффективность абсорбции. На второй стадии загрязненная вода поступает в аэротенк, где она

регенерируется. Очистка воды в аэротенке происходит по обычной схеме с участием кислорода. В ходе очистки сложные органические вещества окисляются микроорганизмами, формирующими активный ил, до конечных продуктов с образованием биомассы.

Рабочим телом *биореактора с оmyваемым слоем* являются иммобилизованные микроорганизмы. Биослой реактора представляет собой гранулы с этими клетками. Он оmyвается водой, содержащей необходимые для развития клеток минеральные вещества. Загрязненный воздух проходит через него; при этом вещества, подлежащие деструкции, диффундируют в водную пленку, покрывающую частицы биокатализатора, и далее окисляются микроорганизмами. Скорость деструкции может лимитироваться скоростью диффузии веществ из газовой фазы в жидкую, а также скоростью протекания реакций в микробных клетках. Скорость диффузии, в свою очередь, зависит от природы токси-

ческих веществ и их концентраций. Стационарный режим биореактора с омываемым слоем наступает через 5–10 дней после его запуска. При использовании заранее адаптированных к очищаемым веществам микроорганизмов этот срок может быть сокращен до нескольких часов. Периодически (обычно раз в несколько месяцев) биослой очищают от избытка биомассы и наполняют свежими гранулами.

Основные требования, предъявляемые к установкам биологической очистки газов, заключаются в простоте и эксплуатационной надежности конструкции, высокой удельной производительности и высокой степени очистки. Удельная производительность установки измеряется отношением объема воздуха, прошедшего через нее за 1 ч, к общему объему установки.

Масштабы промышленного применения методов биологической очистки воздуха в настоящее время весьма незначительны. Наиболее распространенным типом установок являются биофильтры. Они достаточно дешевы, малозатратны, требуют незначительных расходов воды. Однако из-за низкого содержания микроорганизмов в единице объема материала фильтрующего слоя производительность биофильтров сравнительно невысока — от 5 до 400 м³ очищаемого воздуха на 1 м² поперечного сечения фильтрующего слоя в час. Высота биофильтров невелика — около 1 м (это обусловлено требованиями однородности структуры и газодинамическими ограничениями). Поэтому биофильтры занимают большие площади (от 10 до 1600 м²).

Степень очистки воздуха в биофильтрах достаточно высока. Например, используемые в сельском хозяйстве Германии биофильтры обеспечивают 90%-ю очистку воздуха от дурнопахнущей органики. Повышение эффективности работы биофильтров достигается созданием установок, в которых обеспечивается более равномерное прохождение воздуха через рабочее тело установки.

Так, немецкой фирмой «Гербург Вейз» разработан биофильтр, через который сверху вниз противотоком к вводимому снизу воздуху проходит тонко измельченный компост, получаемый при переработке мусора и шлама. Компост выгружается на дно установки и транспортером вновь

подается в ее верхнюю часть. Такой движущийся биологически активный компост обеспечивает равномерное прохождение через него очищаемого воздуха; степень извлечения из воздуха алканов, толуола, сероводорода составляет 96,7–99,9 %. Повышение эффективности работы биофильтров, безусловно, связано с повышением энергозатрат на процесс биоочистки.

Биоскрубберы, по сравнению с биофильтрами, занимают меньшую площадь, так как представляют собой башни высотой несколько метров. Эксплуатационные затраты при использовании биоскрубберов выше, так как процесс биоочистки воды требует существенных затрат. Применение биоскрубберов эффективно при наличии в воздухе хорошо растворимых токсических веществ. Их производительность существенно выше, по сравнению с биофильтрами; эффективность очистки также высока. Например, применение биоскрубберов для очистки отходящих газов металлургических предприятий дает следующие показатели: производительность — 120 тыс. м³/ч, снижение интенсивности запаха воздуха — от 75 до 85 %, степень конверсии органических примесей — 50 %.

Наиболее перспективными для очистки воздуха являются биореакторы с омываемым слоем. Практически не уступая в степени очистки другим установкам, они характеризуются более высокой удельной производительностью (несколько тысяч кубометров очищаемого воздуха в час). Такие малогабаритные биореакторы очень эффективны для очистки воздуха предприятий интенсивного животноводства. Степень очистки воздуха от ацетона, бутанола, пропилового альдегида, этилацетата в реакторе с иммобилизованными на активированном угле микроорганизмами достигает 90 % при удельной производительности установки 10 тыс. м³/ч.

Описаны другие подходы, применяемые для очистки воздуха, например на основе растущей суспензии микроорганизмов. Пропускание воздуха, насыщенного сероводородом, сернистым ангидридом и парами серной кислоты, через интенсивную культуру микроводоросли *Chlorella*, имеющую большую поверхность контакта суспензии с воздухом,

обеспечивает 100% -ю очистку воздуха при производительности установки до 1 млн м³/ч.

Известны способы комплексной очистки стоков и загрязненного воздуха от алифатических кислот, спиртов, альдегидов и углеводов в аэротенке с активным илом. Показана возможность эффективной очистки отходящего воздуха ряда фармацевтических производств на основе иммобилизованных микробных клеток. Производительность установки достигает: по ацетону — 164 г углерода/м³ · ч; по смеси этанол + пропанол — 57 г/м³ · ч; по дихлорэтану — 15 г/м³ · ч. Для детоксикации цианида в промышленных выбросах предложены биологические методы, включая применение различных биологических агентов — от активного ила до специфических ферментов, разрушающих цианиды. Так, раданаза, обнаруженная у *Bacillus stearotherophilus*, катализирует превращение цианида в тиоцианат, а иммобилизованная цианидгидратаза гидролизует цианид до формамида. Образующиеся во многих производственных процессах восстановленные соединения серы (тиосульфат, сероводород, метилмеркаптаны, диметилсульфид) могут служить источником энергии для многих микроорганизмов.

Один из методов очистки от сероводорода состоит в пропускании воздуха через солевой раствор меди. Образующийся в результате этого нерастворимый сульфид металла далее может быть окислен при участии микроорганизмов. Возможно создание системы биоочистки воздуха от сероводорода и органических соединений серы с использованием тиобацилл; при анаэробных условиях десульфурование сопряжено с денитрификацией:



Таким образом, в настоящее время в промышленных масштабах применяются достаточно эффективные биологические процессы для очистки газовойоздушных выбросов. Существуют реальные научные основы для разработки и внедрения новых методов биоочистки.

8.4. Биогeотехнология и получение металлов

Биогeотехнология изучает процессы извлечения металлов из руд, концентратов, горных пород и водных растворов под воздействием микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности при нормальном давлении и физиологической температуре (от 5 до 90 °С).

Бактериальное выщелачивание. Применение биогeотехнологии металлов обусловлено исчерпаемостью доступных природных ресурсов минерального сырья и необходимостью разработки сравнительно небогатых и трудноперерабатываемых месторождений.

Биогeотехнологические методы, такие, как микробиологическая адсорбция и бактериальное выщелачивание, позволяют получить дополнительное количество цветных металлов за счет утилизации шламов и отходов металлургических производств, переработки так называемых забалансовых руд и извлечения их из морской воды и стоков. Использование этих методов интенсифицирует добычу минерального сырья, удешевляет ее, исключает необходимость применения трудоемких горных технологий и позволяет автоматизировать процесс.

За тысячелетие до нашей эры римляне и финикийцы извлекали медь из рудничных вод. В Средние века в Испании и Англии использовали процесс «выщелачивания» для получения меди из медьсодержащих минералов. Безусловно, древние горняки не могли предположить, что активным элементом данного процесса являются микроорганизмы. Впервые это было доказано в 1947 г., когда в США А. Колмер и Г. Хинкли выделили из шахтных дренажных вод микроорганизмы, окисляющие двухвалентное железо и восстанавливающие серу. Они были идентифицированы как *Thiobacillus ferrooxidans*. Вскоре было установлено, что эти железоокисляющие бактерии в процессе окисления переводят медь из рудных минералов в раствор. Позднее были выделены и описаны многие другие микроорганизмы, участвующие в процессах окисления сульфидных минералов. В 1958 г. в США был зарегистрирован первый патент на получение металлов из концентратов с помощью железоокисляющих микроорганизмов.

В настоящее время процесс бактериального выщелачивания достаточно широко применяют для получения меди. Меньшие масштабы имеет бактериальное выщелачивание урана. На основании многочисленных исследований принято считать бактериальное выщелачивание перспективным процессом для внедрения в горнодобывающую промышленность.

Обычное производство большинства металлов на начальной стадии предусматривает концентрирование металлосодержащего минерала из руды. В концентратах содержание металлов может на порядок превосходить их уровень в исходных рудах и породах. Бактериальное выщелачивание сульфидных концентратов имеет несомненные достоинства, так как может быть реализовано непосредственно в месте получения концентрата в районе разрабатываемого месторождения, без больших и дорогостоящих затрат на транспортировку. Однако лимитирующими факторами бактериального выщелачивания являются довольно низкие скорости протекания этих процессов, а также неполная растворимость некоторых металлов.

Работы последних лет показали, что экономически выгодно получать медь из халькопиритного концентрата, так как скорость выщелачивания может достигать 700 мг/л · ч, а образуемый при этом раствор содержит 30–50 г/л меди. Известны бактериальные технологии получения цинка, меди и кадмия из смешанных сульфидных концентратов с 94% -й степенью экстракции названных металлов.

В меньших масштабах применяется в горнодобывающей промышленности другой биотехнологический процесс — *извлечение металлов из водных растворов*. Это направление обещает существенные перспективы, так как предполагает достаточно дешевые процессы очистки стоков от металлов и экономичное получение при этом сырья.

Определенный интерес для биосорбции металлов из растворов представляют денитрифицирующие бактерии, особенно представители родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*. Эти микроорганизмы, будучи факультативными анаэробами, используют в качестве акцептора электронов окислы азота (NO_3^- , NO_2^- , N_2O) или кислород, а донорами

электронов могут служить различные органические соединения, водород, восстановленные соединения серы. Сульфатовосстанавливающие бактерии, которые используют в качестве доноров электронов молекулярный водород и органические соединения, в анаэробных условиях восстанавливают сульфаты, SO_2 , S_2O_2 , иногда SO .

Некоторые гетеротрофные микроорганизмы способны разрушать горные породы в результате выделения органических продуктов обмена — органических кислот, полисахаридов. Источником энергии и углерода для организмов служат различные органические вещества. Так, силикатные породы деструктурируют представители рода *Bacillus*, разрушая связи Si-O-Si . Грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и других также активные деструкторы силикатов.

Все названные выщелачивающие бактерии переводят в ходе окисления металлы в раствор, но разными путями. Различают прямые и непрямые методы бактериального окисления металлов.

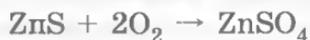
Процесс окисления железа и серы бактериями является **прямым** окислительным процессом:



В результате прямого бактериального окисления окисляются пирит:



и сфалерит:



Ион трехвалентного железа, образующийся в результате окисления бактериями двухвалентного железа, служит сильным окисляющим агентом, переводящим в раствор многие минералы, например халькоцит:



и уранит:



Выщелачивание, происходящее при участии иона Fe^{3+} , который образуется в результате жизнедеятельности бактерий, называется **непрямым окислением**. Часто в ходе непрямого окисления минералов образуется элементарная сера, которая может непосредственно окисляться бактериями до серной кислоты.

Сложный процесс бактериального окисления сульфидных минералов включает адсорбцию микроорганизмов на поверхности минерала или горной породы, деструкцию кристаллической решетки, транспорт в клетку минеральных элементов и их внутриклеточное окисление.

Бактериальное выщелачивание, называемое также *биогидрометаллургией* или *биоэкстрактивной металлургией*, в промышленных масштабах довольно широко применяют для перевода меди и урана в растворимую форму. Существует несколько способов проведения бактериального выщелачивания металлов. Все они основаны на стимуляции роста железобактерий, способных окислять двухвалентное железо и серу. Эти методы весьма экономичны и чисты в экологическом плане, достаточно просты и способны к самоподдержанию, благодаря образованию агента — растворителя металлов в виде раствора Fe^{3+} . Все полученные при бактериальном выщелачивании продукты реакции находятся в растворах, которые можно легко нейтрализовать. Вредные побочные газообразные продукты отсутствуют, а процесс не зависит от масштабов его проведения. К трудностям реализации биологических методов относятся необходимость поддержания активной микробной культуры в строго контролируемых, заданных условиях; низкие, по сравнению с химическими процессами, скорости реакций, взаимосвязь процессов выщелачивания со скоростями роста микроорганизмов.

Поверхностное выщелачивание куч и отвалов в основном сводится к извлечению металлов из отходов горнодобывающей промышленности или побочных бедных руд, переработка которых обычными способами неэкономична. Методы поверхностного выщелачивания куч и отвалов, применяемые в настоящее время, мало чем отличаются от процесса, который использовали в XVIII в. в Испании на месторожде-

нии Рио-Тинто для извлечения меди из руд выветрившейся породы. Эти методы применяют обычно при извлечении меди из пород с низким ее содержанием (менее 0,4 % по весу). Такие отвалы накапливаются в больших количествах при крупномасштабной открытой разработке руды, они могут занимать огромные площади и достигать в высоту нескольких сот метров.

Выщелачивание куч несколько отличается от выщелачивания отвалов. Кучи содержат повышенное, по сравнению с отвалами, содержание металла, извлечение которого в принципе возможно за достаточно короткий срок — несколько месяцев. В то же время выщелачивание отвалов может длиться годами. В кучах и отвалах измельченная руда уложена на наклонное водонепроницаемое основание. Поверхности куч и отвалов орошают выщелачивающей жидкостью, представляющей собой слабый раствор кислоты и ионов трехвалентного железа. Сбор раствора с извлеченным металлом, профильтровавшимся через слой породы, производят снизу. При выщелачивании отвалов в них, как правило, развиваются природные микроорганизмы, а кислая среда и наличие кислорода способствуют повышению каталитической активности *Thiobacillus ferrooxidans*. Выщелачивающая жидкость с помощью насосов подается поверх кучи руды, распыляется по ее поверхности и, стекая вниз самотеком, фильтруется, проходя через нее. Эти обогащенные металлом растворы направляют в специальные пруды и водоемы для сбора и извлечения металла методом простого осаждения, электролизом или более сложными методами. Отработанные выщелачивающие растворы, содержащие в основном растворенное железо, регенерируют в окислительных прудах и вновь подают в отвалы.

Скорость извлечения металла при промышленном выщелачивании куч и отвалов зависит от многих факторов — активности культуры, качества руды и степени ее дисперсности, скорости фильтрации выщелачивающего раствора, аэрации. Так, при введении сжатого воздуха в толщу выщелачиваемой медной руды скорость извлечения меди возрастает на 25 %.

Применяемое, например, в штате Нью-Мексико (США) выщелачивание отвалов дает суточную добычу меди около

45–50 т. Себестоимость получаемой таким способом меди в полтора-два раза ниже, по сравнению с обычными методами гидро- и пирометаллургии. В целом в США 15 % меди получают в процессах бактериального выщелачивания куч и отвалов.

Существенно реже используют микроорганизмы для выщелачивания в промышленных масштабах урана. При этом порода или руда должна быть богата сульфидными минералами и не слишком интенсивно поглощать кислород. В восточных районах Канады подземное бактериальное выщелачивание применяют для извлечения остаточного урана на выработанных площадках. Для этого стенки и крыши забоев промывают подкисленной водой. Развивающиеся естественные железобактерии *Thiobacillus ferrooxidans* окисляют двухвалентное железо до трехвалентного, которое окисляет четырехвалентный уран до шестивалентного, переводя его в раствор:



Возможно также прямое окисление урана бактериями:



Спустя три-четыре месяца забой снова промывают. Промывные воды, содержащие уран, собирают; уран извлекают растворителями либо с помощью ионного обмена. Этим способом можно извлечь до 90 % остаточного урана.

Можно применять бактериальное выщелачивание в качестве первичной технологии для получения урана — так называемой технологии *in situ*. Рудное тело разрушают взрывом для увеличения проницаемости и поверхностной площади. Через скважины руда инжeктируется слабым раствором серной кислоты и насыщается воздухом. Через них же возможен отвод рудничных вод с извлеченным ураном. Преимуществами данного метода являются его независимость от погодных условий, сохранность поверхности месторождения и отсутствие груды отвалов.

Однако процесс выщелачивания *in situ* более трудоемкий, по сравнению с поверхностным выщелачиванием. Чтобы контролировать его течение и состояние микроорганиз-

мов, необходимо создавать специальные инженерные схемы, так как в условиях глубинных залегающих пластов из-за высокого давления, гипербарии кислорода и прочих факторов возможно изменение физиологического состояния железистоокисляющих бактерий, а следовательно, нарушение технологического цикла.

Наиболее сложен процесс бактериального выщелачивания в аппаратах — так называемое *чановое выщелачивание*. Этот тип выщелачивания применяют в горнорудной промышленности для извлечения урана, золота, серебра, меди и других металлов из окисных руд или упорных сульфидных концентратов.

Чановое выщелачивание упорных сульфидных концентратов проводят в проточном режиме в серии последовательно соединенных аппаратов большого объема (30 × 50 × 6 м) с перемешиванием, аэрацией, при стабилизации рН, температуры и концентрации микроорганизмов в пульпе. Перед загрузкой в аппараты концентраты измельчают и смешивают со слабым раствором серной кислоты. На ход процесса влияют многие параметры: рН, температура, скорость потока пульпы, ее плотность и размер частиц концентрата. Важным условием чанового выщелачивания является наличие систем, контролирующих и стабилизирующих многие из перечисленных параметров, что обеспечивает эффективное протекание процесса. Схема чанового выщелачивания сульфидных концентратов замкнутая. Обратные воды после регенерации используют в качестве питательной среды для бактерий и выщелачивающего раствора.

Определенную проблему представляет обеспечение процесса инокулятом. При чановом выщелачивании работают с плотными пульпами при концентрации клеток в культуре до 1,0–1,5 г/л АСБ. Для получения активной микробной культуры существует несколько способов. Наиболее эффективен способ культивирования железистоокисляющих бактерий в проточном электрохимическом культиваторе, что сопряжено с электровосстановлением субстрата. В ходе роста микроорганизмы окисляют двухвалентное железо до трехвалентного, а в ходе электрохимических превращений железо восстанавливается до двухвалентного и снова служит

субстратом для микроорганизмов. В промышленных масштабах чановое выщелачивание применяется при переработке комплексных медно-цинковых концентратов. В составе этих комплексных концентратов присутствуют несколько минералов — халькопирит (CuFeS_2), пирит (FeS_2), сфалерит (ZnS). За 72–96 ч выщелачивания извлекают около 90 % Zn, а также Cu и Fe — соответственно 25 и 5 %.

Оловосодержащие концентраты включают пирит, халькопирит, арсенопирит и оловянные минералы в виде окислов олова. Из этого комплекса минералов бактерии окисляют прежде всего низкопотенциальный арсенопирит (FeAsS).

Мышьяк представляет собой вредную примесь и чрезвычайно затрудняет извлечение олова или золота из таких концентратов. Селективное бактериальное выщелачивание мышьяка позволяет получить оловянный и медный концентраты. Применение этого подхода делает перерабатываемыми труднодоступные золотосодержащие концентраты, которые входят в состав пирита и арсенопирита. Золото в таких концентратах тонко вкраплено в кристаллическую решетку, и извлечь его методом цианирования можно только после ее разрушения. Пирометаллургический обжиг таких мышьяксодержащих концентратов сильно загрязняет окружающую среду вредными арсинами (AsH_3) и дает низкую степень извлечения благородных металлов, а потому малопригоден. Применение бактериального выщелачивания позволяет в экологически безопасном процессе селективно извлечь мышьяк из концентратов и перевести его в раствор. После извлечения мышьяка из таких концентратов удастся также извлечь методом цианирования до 90 % золота и серебра.

Обогащение руд и концентратов относится к перспективным направлениям биогеотехнологии металлов. Весьма эффективным представляется применение для этих целей сульфатредуцирующих бактерий, с помощью которых можно разработать принципиально новые процессы и существенно улучшить существующие. При проведении процессов флотации окисленных минералов свинца и сурьмы использование сульфатредуцирующих бактерий на 6–8 % повышает извлечение минералов в результате сульфидизации

окислов; в процессах флотации церуссита ($PbCO_3$) извлечение свинца возрастает на 20–25 %.

Применение сульфатредуцирующих бактерий для десорбции ксантогената с поверхности некоторых минералов после флотации позволяет селективно разделить некоторые минералы (медь, молибден, свинец, цинк и др.).

Следовательно, биогеотехнологические методы извлечения металлов могут дополнить (а в некоторых случаях и частично заменить) традиционные методы горнодобывающей отрасли. Так, медь и уран получают в больших масштабах в процессах кучного и подземного выщелачивания; с помощью чанового выщелачивания удастся перерабатывать многие концентраты и получать цинк, медь, олово, серебро, золото и др. Разрабатываются и находят все большее применение процессы биосорбции металлов из растворов и сточных вод; намечены подходы к использованию биогеотехнологических методов при обогащении руд и концентратов. Внедрение биогеотехнологии металлов позволяет увеличивать сырьевые ресурсы, обеспечивает комплексное извлечение металлов и не требует сложной горнодобывающей техники; происходящие при этом процессы легко поддаются регулированию и автоматизации и позволяют решать многие природоохранные задачи.

8.5. Биоэнергетика

Интерес к биоэнергетике как науке о путях и механизмах трансформации энергии в биологических системах велик, поскольку энерговооруженность относится к факторам, определяющим уровень развития общества. В последнее время для сравнения эффективности тех или иных процессов и технологий все чаще прибегают к энергетическому анализу, который успешно используется в экологии. Основная задача энергетического анализа заключается в планировании таких методов производства, которые обеспечивают наиболее эффективное потребление ископаемых и возобновляемых энергоресурсов, а также охрану окружающей среды.

За всю историю развития человеческого общества потребление энергии в расчете на одного человека возросло

более чем в 100 раз. При этом через каждые 10–15 лет мировой уровень потребления энергии практически удваивается, а запасы традиционных источников энергии (нефти, газа) истощаются. Кроме того, сжигание ископаемых видов топлива приводит к нарастающему загрязнению окружающей среды. Поэтому становится очень важным получать энергию за счет экологически чистых технологий.

Неиссякаемым источником энергии на Земле является Солнце. Каждый год на поверхность Земли с солнечной энергией поступает 3×20^{24} Дж энергии. В то же время, по оценкам специалистов, разведанные запасы нефти, угля, природного газа, урана эквивалентны $2,5 \times 10^{22}$ Дж, т. е. менее чем за одну неделю Земля получает от Солнца такое же количество энергии, какое содержится во всех ее топливных запасах.

Важным направлением является поиск новых источников энергии. Так, величина солнечной энергии, падающей на неосвоенные территории, например пустыни (около 2107 км^2), составляет около 51 тыс. кВт · ч. При освоении этой энергии хотя бы с 5%-м КПД уровень мирового производства энергии можно увеличить более чем в 200 раз. Таким образом, при возможном народонаселении земного шара в 10 млрд человек получение энергии только с поверхности зоны пустынь будет в 10–12 раз превышать энергетические потребности человечества.

Принципиально возможно также освоение солнечной энергии, падающей на поверхности морей и океанов. При этом первично преобразование солнечной энергии происходит за счет синтеза биомассы фитопланктона; вторичный процесс представляет собой конверсию биомассы в метан и метанол. Плантации микроводорослей, по оценкам специалистов, являются наиболее продуктивными системами: 50–100 т/га в год.

Растительный покров Земли составляет свыше 1800 млрд т сухого вещества, образованного в процессах фотосинтеза лесными, травяными и сельскохозяйственными экосистемами. Существенная часть энергетического потенциала биомассы потребляется человеком. Для сухого вещества простейшим способом превращения биомассы в энергию является сгорание, в процессе которого выделяется тепло, преобразуемое

далее в механическую или электрическую энергию. Сырая биомасса также может быть преобразована в энергию в процессах биометаногенеза и получения спирта.

Получение топлива по схеме «биомасса — биотехнология» основывается на сочетании фотосинтеза, животноводства, кормопроизводства и ферментации с использованием тех или иных биологических агентов.

Научные и аналитические исследования последнего десятилетия приводят к выводу, что наиболее эффективными и обнадеживающими для крупномасштабного преобразования солнечной энергии являются методы, основанные на использовании биосистем, в числе которых достаточно хорошо освоенные биологические технологии превращения биомассы в энергоносители в процессах биометаногенеза и производства спирта, а также принципиально новые разработки, направленные на модификацию и повышение эффективности самого процесса фотосинтеза, создание биотопливных элементов, получение фотоводорода, биоэлектрокатализ.

Биометаногенез, или *метановое брожение*, давно известный процесс превращения биомассы в энергию. Он был открыт в 1776 г. Вольтой, который установил наличие метана в болотном газе. Биогаз, получаемый из органического сырья в ходе биометаногенеза в результате разложения сложных органических субстратов различной природы при участии смешанной из разных видов микробной ассоциации, представляет собой смесь из 65–75 % метана и 20–35 % углекислоты, а также незначительных количеств сероводорода, азота, водорода. Теплотворная способность биогаза зависит от соотношения метана и углекислоты и составляет 5–7 ккал/м³; 1 м³ биогаза эквивалентен 4 кВт · ч электроэнергии; 0,6 л керосина; 1,5 кг угля и 3,5 кг дров. Неочищенный биогаз используют в быту для обогрева жилищ и приготовления пищи, а также в качестве топлива в стационарных установках, вырабатывающих электроэнергию. Компримированный газ можно транспортировать и использовать (после предварительной очистки) в качестве горючего для двигателей внутреннего сгорания. Очищенный биогаз аналогичен природному газу.

В процессах биометаногенеза решается не только проблема воспроизводства энергии, эти процессы чрезвычайно важны в экологическом плане, так как позволяют решать проблему утилизации и переработки отходов — производственных и технологических, сельскохозяйственных и промышленных, а также бытовых, включая сточные воды и твердый мусор городских свалок.

В сложных процессах деструкции органических субстратов и образования метана участвует микробная ассоциация различных микроорганизмов. В ассоциации присутствуют микроорганизмы-деструкторы, вызывающие гидролиз сложной органической массы с образованием органических кислот (масляной, пропионовой, молочной), низших спиртов, аммиака, водорода; ацетогены, превращающие эти кислоты в уксусную кислоту, водород и окислы углерода, и, наконец, собственно метаногены — микроорганизмы, восстанавливающие водородом кислоты, спирты и окислы углерода в метан.

С биохимической точки зрения метановое брожение — это процесс анаэробного дыхания, в ходе которого электроны с органического вещества переносятся на уголекислоту; последняя затем восстанавливается до метана (при истинном брожении конечным акцептором электронов служит молекула органического вещества, являющегося конечным продуктом брожения). Донорами электронов для метаногенов служит водород, а также уксусная кислота.

Деструкцию органической массы и образование кислот вызывает ассоциация облигатных и факультативных анаэробных организмов, в числе которых гидролитики, кислотогены, ацетогены и др. Это представители родов *Enterobacteriaceae*, *Lactobacilaceae*, *Streptococcaceae*, *Clostridium*, *Butyrivibrio*. Активную роль в деструкции органической массы играют целлюлозоразрушающие микроорганизмы, так как растительные биомассы, вовлекаемые в процессы биометаногенеза, характеризуются высоким содержанием целлюлозы (лигнинцеллюлозы). В превращении органических кислот в уксусную существенное значение имеют ацетогены — специализированная группа анаэробных бактерий.

«Венцом» метанового сообщества являются собственно метаногенные, или метанобразующие, бактерии (архебакте-

рии), катализирующие восстановительные реакции, приводящие к синтезу метана. Субстратами для реализации этих реакций являются водород и углекислота, а также окись углерода и вода, муравьиная кислота, метанол и др.:



Несмотря на то что метанобразующие бактерии выделены и описаны сравнительно недавно — в середине 1980-х гг., их возникновение относят к Архею и возраст оценивают в 3,0–3,5 млрд лет. Эти микроорганизмы достаточно широко распространены в природе в анаэробных условиях. Вместе с другими микроорганизмами активно участвуют в деструкции органических веществ с образованием биогаза в морских осадках, болотах, речных и озерных илах. От прокариотических микроорганизмов археобактерии отличаются отсутствием муреина в клеточной стенке; специфическим, не содержащим жирных кислот составом липидов; наличием специфических компонентов метаболизма в виде кофермента М (2-меркаптоэтансульфоновая кислота) и фактора F420 (особый флавин); специфической нуклеотидной последовательностью 16S рРНК.

Внутри данной группы отдельные представители метанобразующих бактерий могут существенно отличаться друг от друга по ряду показателей, включая содержание Г — Ц в ДНК. На этом основании их подразделяют на три порядка, которые включают несколько семейств и родов. К настоящему времени выделены в чистой культуре и описаны около 30 метанобразующих бактерий; список этот непрерывно пополняется. Наиболее изучены метанобактерии *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanosarcina barkerii*, *Methanobrevibacter ruminantium*. Все метаногены — строгие анаэробы; среди них встречаются как мезофильные, так и термофильные формы; гетеротрофы и автотрофы. Особенностью метанобразующих бактерий является также способность активно развиваться в тесном симбиозе с другими группами микроорганизмов, обеспечивающими метаногенов условиями и субстратами для образования метана.

В процессах метаногенеза можно переработать самое разнообразное сырье — различную растительную биомассу,

включая отходы древесины, несъедобные части сельскохозяйственных растений, отходы перерабатывающей промышленности, специально выращенные культуры (водяной гиацинт, гигантские бурые водоросли), жидкие отходы сельскохозяйственных ферм, промышленные и бытовые стоки, ил очистных сооружений, а также мусор городских свалок. Важно, что сырье с высоким содержанием целлюлозы, трудно поддающееся методам переработки, также эффективно сбраживается и трансформируется в биогаз.

Установки для биометаногенеза с учетом их объемов и производительности можно подразделить на несколько категорий: реакторы для небольших ферм сельской местности (1–20 м³), реакторы для ферм развитых стран (50–500 м³), реакторы для переработки промышленных стоков, например спиртового и сахарного производств (500–10 000 м³), и реакторы для переработки твердого мусора городских свалок (до 20 тыс. м³).

Метантенки, изготовленные из металла или железобетона, могут иметь разнообразную форму, включая кубическую и цилиндрическую. Конструкции и детали этих установок несколько варьируют, что связано в основном с типом перерабатываемого сырья. Существует огромное разнообразие установок для реализации процесса метаногенеза, конструкционные детали и компоновка которых определяются приоритетностью задачи, решаемой в конкретном процессе: либо это утилизация отходов и очистка стоков, либо получение биогаза требуемого качества. Так, среди действующих в развитых странах установок есть как средние, так и большие по объему аппараты (дайджестеры), снабженные устройствами для очистки и компремирования биогаза, электрогенераторами и очистителями воды. Такие установки могут входить в состав комплексов с промышленными предприятиями (сахароперерабатывающими, спиртовыми, молокозаводами), канализационными станциями или крупными специализированными фермами. Когда главной целью процесса является утилизация отходов, в конструкции установок должен быть предусмотрен блок для фракционирования и отделения крупных твердых частиц.

Метантенки могут работать в режиме полного перемешивания, полного вытеснения, как анаэробные биофильтры

или реакторы с псевдооживленным слоем, а также в режиме контактных процессов. Простейшая конструкция метантенка — это обычная бродильная яма в грунте с фиксированным объемом газа. Метантенк представляет собой герметичную емкость, частично погруженную в землю для теплоизоляции и снабженную устройствами для дозированной подачи и подогрева сырья, а также газгольдером — емкостью переменного объема для сбора газа. Очень важно, чтобы в метантенках обеспечивался требуемый уровень перемешивания весьма гетерогенного содержимого аппарата. Вместе с тем известно, что максимальное выделение метана наблюдается в системах со слабым перемешиванием. Поэтому, в отличие от аэробных процессов, требующих интенсивной аэрации и перемешивания, перемешивание при метаногенезе главным образом должно обеспечивать гомогенизацию бродящей массы, препятствовать оседанию твердых частиц и образованию твердой плавающей корки.

В зависимости от типа исходного материала, сбраживаемого в метантенке, интенсивность процесса, включая скорость подачи и полноту переработки, существенно варьирует. При переработке жидких отходов животноводческих ферм соотношение между твердыми компонентами и водой в загружаемой массе должно составлять примерно 1 : 1, что соответствует концентрации твердых веществ от 8 до 11 % по весу. Смесь материала обычно засевают ацетогенными и метанобразующими микроорганизмами из отстоя сброженной массы от предыдущего цикла или другого метантенка. Температура и, следовательно, скорость протекания процесса зависят от вида используемого метанового сообщества. Для термофильных организмов процесс реализуется при 50–60 °С, для мезофильных — при 30–40 °С, для психрофильных — около 20 °С. При повышенных температурах скорость процесса в два-три раза выше, по сравнению с мезофильными условиями.

В ходе сбраживания органической массы на первой (так называемой кислотной) фазе в результате образования органических кислот снижается рН среды. При резком сдвиге рН среды в кислую сторону возможно ингибирование метаногенов. Поэтому процесс ведут при рН 7,0–8,5. Против за-

кисления используют известь. Снижение рН среды служит своеобразным сигналом о том, что процесс деструкции органики с образованием кислот закончен, т. е. в аппарат можно подавать новую партию сырья для переработки. Оптимальное соотношение С : N в перерабатываемой органической массе находится в диапазоне 11–16 : 1. Изменение соотношения С : N в исходном материале в сторону увеличения содержания азота приводит к выделению аммиака в среду и защелачиванию. Поэтому жидкие навозные отходы, богатые азотсодержащими компонентами, разбавляют резаной соломой или различными жомами.

Процессы, протекающие при метановом брожении, эндотермичны и требуют подвода энергии в виде тепла извне. Для подогрева загружаемого сырья и стабилизации температуры процесса на требуемом уровне обычно сжигают часть образуемого биогаза. В зависимости от температуры процесса, количество биогаза, идущего на обогрев процесса, может достигать 30 % от объема получаемого.

Скорость поступления сырья на переработку или время удержания сырья в аппарате являются важными и контролируемыми параметрами. Чем интенсивнее процесс брожения, тем выше скорость загрузки и тем меньше время удержания. Однако важным условием стабильности процесса биометаногенеза, как и любой проточной культивационной системы, является сбалансированность потоков субстрата со скоростью размножения продуцента.

Скорость подачи субстрата в метантенк должна быть равной скорости роста бактерий метанового сообщества, при этом концентрация субстрата (по органическому веществу) должна быть стабилизирована на уровне не ниже 2 %. При уменьшении концентрации субстрата плотность бактериального сообщества снижается, и процесс метаногенеза замедляется.

Наибольший выход продукции обеспечивается более высокой скоростью подачи субстрата, что, в свою очередь, требует стабилизации в аппарате достаточно высокой концентрации микроорганизмов.

Возможны осложнения процесса, которые зависят от характера перерабатываемой органики. Если в перерабаты-

ваемом материале содержится много труднорастворимых веществ, в реакторе накапливаются неразрушенные твердые вещества (до 80 % осадка). При больших количествах растворимой и легкодоступной органики образуется большое количество микробной биомассы в виде активного ила (до 90 % осадка), который трудно удержать в реакторе. Чтобы избежать подобных осложнений, применяют химический или ферментативный гидролиз исходного сырья (помимо его механического измельчения), обеспечивают оптимальное перемешивание в метантенке подаваемого сырья с активным илом, перемешивают осадок и т. д.

Нормы загрузки сырья в существующих процессах метаногенеза колеблются в пределах 7–20 % объема субстрата от объема биореактора в сутки. Цикличность процесса — 5–14 суток. Обычно время сбраживания животноводческих отходов составляет около двух недель. Растительные отходы перерабатывают дольше — 20 суток и более.

Особенно трудны для переработки твердые отходы, поэтому переработка более длительна. В результате модификации и усовершенствования процесса можно существенно изменить скорость потока сырья через метантенк. Цикличность процесса может быть сокращена до 5–15 ч при увеличении скорости загрузки до 150–400 % от общего суточного объема.

Интенсифицировать процесс можно повышением его температуры и использованием термофильного сообщества, но это требует дополнительных энергозатрат. Для увеличения эффективности метанового сообщества в метантенке применяют так называемые анаэробные биофильтры, или метантенки второго поколения. В анаэробном биофильтре микроорганизмы находятся в иммобилизованном состоянии. В качестве носителя используют галечник, керамзит, стекловолокно и др. В таких конструкциях сбраживание материала происходит при существенно меньшей величине текущей концентрации субстрата (0,5 % сухих веществ) с большими скоростями. Это позволяет повысить интенсивность деструкции отходов при уменьшении объемов реакторов.

Эффективно также пространственное разделение процесса в соответствии с характерной для него (с точки зрения

химизма процесса) двухфазностью. Процесс реализуется в двух, соединенных последовательно реакторах. В первом аппарате осуществляется анаэробное разложение органики с образованием кислот, окислов углерода и водорода (кислотная стадия). Параметры процесса брожения в аппарате задаются на уровне, обеспечивающем требуемый выход кислот и рН культуры не выше 6,5. Полученная барда поступает во второй аппарат, в котором происходит процесс образования метана. В такой системе можно независимо варьировать условия ферментации (скорость потока, рН, температуру) в каждом аппарате с учетом создания оптимальных условий для развития микроорганизмов-деструкторов в первом и метаногенов — во втором аппарате. Применение такой биосистемы в два-три раза повышает интенсивность процесса.

Производство биогаза стало одним из основных принципов энергетической политики ряда стран Тихоокеанского региона. Правительство Китая уделило больше внимания и вложило много средств в становление биогазовой промышленности, особенно в сельской местности. В рамках национальной программы были созданы условия для строительства сети заводов, выпускающих биогазовые установки. Правительство поощряло это направление и пошло даже на создание сети региональных и местных структур, ответственных за биогазовую программу. Государственные банки предоставляли населению льготные ссуды и материалы для строительства установок. В 1978 г., через три года после принятия программы, в стране функционировало свыше 7 млн установок, что в 15 раз превосходило уровень 1975 г. В год вырабатывалось около 2,6 млрд м³ биогаза, что эквивалентно 1,5 млн т нефти. В начале 1980-х гг. в Китае производилось до 110 млрд м³ биогаза, что эквивалентно 60–80 млн т сырой нефти, а уже через несколько лет было создано до 70 млн установок, которые покрывали бытовые потребности в энергии примерно 70 % крестьянских семей. В Индии также большое внимание было уделено получению энергии в процессах биометаногенеза при утилизации сельскохозяйственных отходов.

Строительство биогазовых установок начато на Филиппинах, в Израиле, странах Латинской Америки. Интерес к

данной технологии в середине 1980-х гг. усилился в странах Центральной Европы, особенно в ФРГ и во Франции. Комиссариатом по солнечной энергии Франции в середине 1990-х гг. было выделено 240 млн франков на создание и распространение биогазовых установок в сельской местности. Французским исследовательским институтом прикладной химии было показано, что при утилизации и переработке навоза сельскохозяйственных ферм можно полностью обеспечить потребности в энергии комплекса из 30 голов крупного рогатого скота или 500 свиней.

В середине 1990-х гг. в странах Евросоюза функционировало около 600 установок по производству биогаза из жидких сельскохозяйственных отходов и около 20 установок, перерабатывающих твердый городской мусор. В пригородах Нью-Йорка установка по переработке содержимого городской свалки производит около 100 млн м³ биогаза в год. Интегрированные национальные программы многих стран Африки и Латинской Америки, имеющих огромные количества сельскохозяйственных отходов (свыше 90 % мировых отходов цитрусовых, бананов и кофе, около 70 % отходов сахарного тростника и около 40 % отходов мирового поголовья скота), в настоящее время ориентированы на получение биогаза.

8.6. Ксенобиотики и их биодegradация

Ксенобиотики — чужеродные для организмов соединения (пестициды, ПАВ, красители, лекарственные вещества и пр.), которые практически не включаются в элементные циклы углерода, азота, серы или фосфора. Они временно или постоянно накапливаются в окружающей среде и вредно влияют на все живое. Накопление в огромных количествах различных отходов привело к чрезвычайному загрязнению окружающей среды — недр, воды, воздуха, что представляет огромную опасность для человечества.

Судьба ксенобиотиков определяется комплексом физических, химических и особенно биологических факторов. Их биологическая трансформация может протекать в раз-

личных направлениях, приводя к минерализации, накоплению или полимеризации.

Ксенобиотики, которые подвергаются полной деградации (т. е. минерализуются до диоксида углерода, воды, аммиака, сульфатов и фосфатов), используются микроорганизмами в качестве основных ростовых субстратов и проходят полный метаболический цикл.

Частичная трансформация соединений происходит, как правило, в процессах кометаболизма или соокисления и не связана с включением образуемых продуктов в метаболический цикл микроорганизмами.

Некоторые ароматические углеводороды и синтетические полимеры вообще не поддаются биологической трансформации.

Поведение ксенобиотика в природе зависит от многих взаимосвязанных факторов: структуры и свойств самого соединения, физико-химических условий среды и ее биокаталитического потенциала, определяемого микробным сообществом. Все эти факторы в совокупности определяют скорость и глубину трансформации соединений. Нельзя забывать о том, что биологическая деградация ксенобиотиков оправдана только тогда, когда происходят их полная минерализация, разрушение и детоксикация. Это может быть достигнуто в результате всего одной модификации структуры соединения. Однако часто в ходе деградации происходит серия последовательных изменений исходного соединения с участием нескольких микробных видов. Именно благодаря гетерогенности природных микробных сообществ ксенобиотики в принципе могут подвергаться биodeградации, а наличие в микробных сообществах взаимосвязанных метаболических путей разрушения токсинов является основой для борьбы с загрязнением окружающей среды.

Существует два пути борьбы с загрязнением биосферы ксенобиотиками: их сбор и детоксикация до момента попадания в окружающую среду; трансформация или удаление ксенобиотиков, попавших в окружающую среду.

Возможности микробных сообществ по деградации многих токсичных соединений значительны. Доказано, что при

повторном попадании в среду многих химических соединений время до начала их трансформации (так называемый адаптационный период микроорганизмов по отношению к данному субстрату) значительно короче, по сравнению с первым попаданием этого соединения. В течение этого периода микроорганизмы в ходе адаптации к токсическому соединению как субстрату селекционируются по способности деградировать данный субстрат. В результате естественным путем возникают микробные популяции, которые могут сохраняться в почве в течение нескольких месяцев после полной деградации токсиканта.

Для отбора и селекции микроорганизмов, характеризующихся высокой скоростью деградации определенных классов ксенобиотиков, возможно использование различных путей: отбор конститутивных мутантов, отбор на генетическую дупликацию и на основе механизма переноса генов. Повышение деградирующей способности возможно также в результате стимуляции естественной почвенной микрофлоры, уже адаптированной к токсикантам.

При попадании новых веществ в окружающую среду может происходить природное генетическое конструирование, в результате которого возникают микробные формы с новыми катаболическими свойствами. В настоящее время идентифицированы разнообразные природные плазмиды, способствующие катаболизму веществ и встречающиеся у различных представителей почвенной микрофлоры. Особенно часто они встречаются среди рода *Pseudomonas*. Информация, которую несут плазмиды, может расширить круг субстратов хозяина за счет объединения двух метаболических путей, либо полным кодированием нового пути, либо дополнением существующих метаболических путей. Внутри- и межплазмидные рекомбинации приводят к перестановке генов на плаزمидах и возникновению новых метаболических путей. Известны также случаи перераспределения генетического материала между плазмидами и хромосомой хозяина, приводящие к появлению совершенно новых генов. Пластичность катаболических плазмид обеспечивает перераспределение генетического материала, что может привести к возникновению в природе нового организма, эффективно деградирующего новый субстрат.

Таким образом, природные генетические механизмы обмена информацией позволяют получать эффективные штаммы-деструкторы ксенобиотиков. Это очень важно, так как общепринятые методы работы с рекомбинантными ДНК, применяемые для клонирования чужеродной ДНК с небольшим числом генов, имеют существенные ограничения при клонировании метаболических путей деградации ксенобиотиков, кодируемых десятками генов. Ограничения также обусловлены недостатком знаний о механизмах деградации и структуре метаболических путей, а также возможностями риска, связанного с попаданием сконструированных организмов в среду. Методы генетической инженерии могут быть полезными и для модификаций уже существующих микробных клеток со способностью к биодegradации.

Известно, что большинство пестицидов, попадающих в окружающую среду при обработке сельскохозяйственных культур, расщепляются бактериями и грибами. Превращение исходного пестицида в менее сложное соединение достаточно эффективно происходит под воздействием микробных сообществ. При этом уже на первой стадии микробной трансформации высокая токсичность ряда пестицидов может утрачиваться, что позволяет разрабатывать относительно простые микробиологические методы борьбы с ксенобиотиками. Описаны опыты успешного применения ферментов (гидролаз, эстераз, ациламидаз и фосфоэстераз) для проведения первичного гидролиза пестицидов и увеличения степени их последующей биодegradации. Например, с помощью натрионгидролазы из *Pseudomonas sp.* можно достаточно эффективно удалять остаточный паратион из контейнеров с данным пестицидом, а растворы данного фермента применяют для уничтожения разливов паратиона на почвах. На основе иммобилизованных ферментов удаляют пестициды из сточных вод, ферменты применяют также в виде аэрозолей для удаления пестицидов с промышленных установок.

Большую опасность для окружающей среды представляют полиароматические углеводороды. Так, полихлорбифенилы (ПХБ) — очень устойчивые соединения, долго присутствующие в окружающей среде в результате прочной адсорбции биологическими и осадочными породами, а также

плохой миграции. Микроорганизмы не способны полностью деградировать эти соединения, но могут модифицировать их.

Установлена способность микробных сообществ превращать промышленные ПХБ в новые типы углеводов, при этом молекулы с низкой степенью хлорирования расщепляются. Устойчивое полиароматическое соединение бензапирен не минерализуется в системах активного ила, хотя описано несколько видов микроорганизмов, способных частично его метаболизировать. В ходе деградации бензапирена образуются канцерогенные соединения (гидроксиды и эпоксипроизводные).

Также устойчив к деградации полистирол, хотя описано несколько случаев частичной деградации измельченных автомобильных шин, изготовленных из стиролбутадиеновой резины. Есть сообщения о росте микробного сообщества на стироле, в ходе которого разрушается ингибитор полимеризации 4-трет-бутилкатехол; далее происходит свободнорадикальная полимеризация стирола с осаждением образующегося полистирола. Этот полимер впоследствии под воздействием микробного сообщества исчезает из почвы.

Одна из крупнейших групп загрязнителей природы — галогенсодержащие ксенобиотики, которые характеризуются высокой токсичностью и низкой способностью к разрушению. Причина их токсичности и устойчивости определяется наличием в них трудно расщепляемой галогенуглеродной связи.

Однако, как оказалось, ряд галогенсодержащих соединений являются природными образованиями и представляют собой метаболиты бактерий, грибов, водорослей. Это определило судьбу отдельных галогенсодержащих соединений в природе.

Для эффективной трансформации родственного ксенобиотического соединения необходима адаптация микроорганизма, включая его генетическую изменчивость. Длительные исследования путей деградации галогенсодержащих ксенобиотиков показали, что для получения суперштамма, эффективно их разлагающего, нужно модифицировать существующий механизм деградации ароматических соединений.

Идея конструирования катаболических путей принадлежит М. Рейнеке и Кнакмуссу, создавшим штамм *Pseudomonas*,

способный разрушать 4-хлорбензоат. В эксперименте по скрещиванию *Pseudomonas putida* PaW1, обладающего TOL-плазмидой pWWO с *Pseudomonas sp. B13* (pWR1), утилизирующим 3-хлорбензоат, они получили трансконъюгат, способный использовать 4-хлорбензоат в результате переноса гена толуол-1,2-диоксигеназы (контролируемого плазмидой pWWO) в штамм *Pseudomonas sp. B13*. Аналогичный результат был получен при совместном культивировании в хемостате двух культур — *P. aeruginosa*, содержащей плазмиду pAC25, и культуры, содержащей TOL.

Первая плазида, связанная с катаболизмом галогенированных органических соединений (2,4-Д), была обнаружена у *Alcaligenes paradoxus*, затем у других микроорганизмов. Позже появилась серия публикаций о деградации 2,4-Д, однако сообщения по разрушению 2,4,5-трихлоруксусной кислоты (2,4,5-Т) были крайне редки. Впоследствии при совместном культивировании в хемостате в течение 8–10 месяцев микробных культур, содержащих несколько катаболических плазмид, при постепенном увеличении концентрации 2,4,5-Т получили штамм, способный к деградации 2,4,5-Т и трихлорфенола.

Биологические методы применимы также для очистки природной среды от нефтяных загрязнений, представляющих собой как сточные воды нефтяной промышленности, так и непосредственное загрязнение в результате разлива нефти. Сточные воды нефтяной промышленности очищают биологическими методами после удаления физическими методами большей части смеси различных углеводородов. Для этого применяют аэрируемые системы биоочистки с активным илом, содержащим адаптированное к компонентам нефти сообщество. Скорость деградации зависит от качественного состава и концентрации углеводородов, а также от температуры и степени аэрации среды. Наиболее эффективно биодеградация осуществляется, когда нефть эмульгирована в воде.

Особую проблему представляют выбросы и аварийные разливы нефти на поверхность почвы. Это приводит к загрязнению не только пахотных земель, но и источников питьевой воды. В почве содержится много микробных ви-

дов, способных деградировать углеводороды, но их активность часто низка, в частности и за счет дефицита отдельных биогенных элементов. В таких случаях эффективным является внесение в почву так называемых «олеофильных удобрений», в состав которых входят соединения азота, фосфаты и другие минеральные элементы, концентрации которых в почве достаточно низки и лимитируют рост микроорганизмов. После внесения этих соединений в почву концентрация микроорганизмов-деструкторов существенно возрастает, как и скорость деградации нефти.

С помощью генетического конструирования создан «супермикроб» с плазмидами ОСТ и САМ. Такая мультиплазмидная бактерия растет, утилизируя неочищенную нефть. Однако возможность эффективного применения данного организма в естественных условиях требует доказательств.

Изучение возможностей использования методов генетического конструирования микробных штаммов-деструкторов ксенобиотиков в практических целях находится на ранней стадии. Одна из основных проблем при конструировании микроорганизмов на основе природных катаболических плазмид — стабильность. Стабильность систем «хозяин — вектор» особенно важна при интродукции штаммов в естественную среду. При возвращении микроорганизма с новой катаболической функцией в исходную природную среду ему приходится конкурировать с хорошо адаптированной к данным условиям среды естественной микрофлорой, сталкиваться с огромным разнообразием источников углерода, в том числе высокотоксичных. При этом совершенно не ясны перспективы сохранения стабильности новой катаболической функции, а следовательно, самого штамма. Пока же существует большой разрыв между достижениями в области конструирования микроорганизмов и возможностями их практического применения. В будущем наиболее перспективными для детоксикации ксенобиотиков представляются биологические системы, состоящие из микробиологической консорции индивидуальных организмов и микробных сообществ, полученных методами клеточной и генетической инженерии.

8.7. Биоремедиация

Все живые организмы (животные, растения, бактерии и др.) для поддержания жизни поглощают и переваривают питательные вещества и выделяют в окружающую среду образующиеся при этом продукты жизнедеятельности. Разным организмам для поддержания жизни необходимы разные питательные вещества. Некоторые бактерии «с удовольствием» поглощают химические соединения, содержащиеся в отходах, другие питаются токсическими химикатами, такими, как метиленхлорид, детергенты и креозот.

Специалисты в области охраны окружающей среды пользуются двумя методами биоремедиации (биовосстановления) зараженных органическими отходами земель: вносят в зараженную почву либо *специализированные штаммы бактерий*, либо *питательные вещества*, стимулирующие активность уже присутствующих там микроорганизмов. Бактерии поглощают токсины и разлагают их до безвредных продуктов жизнедеятельности. После того как весь запас токсических соединений переработан, численность популяции бактерий-очистителей возвращается к нормальному уровню или же они отмирают.

Различные методы биоремедиации с помощью природных микроорганизмов применяют для обезвреживания промышленных отходов перед их выбросом в окружающую среду, а также для очистки уже существующих загрязнений. В настоящее время несколько усовершенствованных систем очистки, использующих генетически модифицированные микроорганизмы, проходят тестирование на эффективность обезвреживания плохо поддающихся деградации соединений.

В некоторых случаях продукты жизнедеятельности микроорганизмов — «борцов» за чистоту окружающей среды — сами обладают полезными свойствами. Например, бактерии, расщепляющие образующиеся в процессе производства бумаги соединения серы, выделяют метан.

Одним из направлений биоремедиации является *фиторемедиация* — комплекс методов очистки вод, почв и атмосферного воздуха с использованием зеленых растений. На использовании растений были основаны первые прос-

тейшие методы очистки сточных вод (поля орошения и поля фильтрации). Первые научные исследования в этом направлении были проведены в 1950-х гг. в Израиле. Активное развитие метода фиторемедиации началось только в 1980-х гг. Известно, что растение воздействует на окружающую среду разными способами, основными из которых являются:

— ризофильтрация — корни всасывают воду и химические элементы, необходимые для жизнедеятельности растений;

— фитоэкстракция — накопление в организме растения опасных загрязнений (например, тяжелых металлов);

— фитолатерализация — испарение воды и летучих химических элементов (As, Se) листьями растений;

— фитостабилизация — перевод химических соединений в менее подвижную и активную форму (снижает риск распространения загрязнений);

— фитодеградация — деградация растениями и симбиотическими микроорганизмами органической части загрязнений;

— фитостимуляция — стимуляция развития симбиотических микроорганизмов, принимающих участие в процессе очистки.

Главную роль в деградации загрязнений играют микроорганизмы. Растение является своего рода биофильтром, создавая для них среду обитания (обеспечение доступа кислорода, разрыхление грунта). В связи с этим процесс очистки происходит также вне периода вегетации (т. е. не только летом) с несколько сниженной активностью.

В фиторемедиации может быть использован широкий спектр водных растений (гидрботаническая очистка). К ним относятся тростник (*Phragmites communis*), ива (*Salix cinerea*, *Salix peuntandra*), ряска (*Lemna sp.*) и др.

В настоящее время проводятся активные исследования по поиску гипераккумуляторов веществ. Так, в фиторемедиации уже применяется водяной гиацинт (*Eichhornia crassipes*). Изучаются возможности генетической модификации растений, например их трансформации бактериальными генами, ответственными за деградацию органических

веществ, в частности метилртути и взрывчатых веществ. Ученым удалось получить растения, которые могут поглощать мышьяк из почвы. Для этого в геном *Arabidopsis thaliana* ввели два гена из генома бактерии *E. coli*. Соединения мышьяка обычно накапливаются в почве вблизи районов добычи полезных ископаемых и хранения промышленного мусора. Даже небольшая концентрация мышьяка вызывает повреждения нервной системы и способствует возникновению рака. Очень опасно, когда мышьяк попадает в воду. Особенно тяжелая ситуация с загрязнением соединениями мышьяка сложилась в Бангладеш и индийском штате Западная Бенгалия, где от этого страдают миллионы людей.

Традиционные методы очистки почв, загрязненных соединениями мышьяка, кадмия, ртути, меди и цинка, предполагают полное удаление почвы в этих регионах, перевоз и хранение ее в другом месте. Однако если соединения мышьяка будут накапливаться в листьях и стеблях растений, то методы очистки станут намного дешевле и безопаснее. Полагают, что с помощью методов генетической инженерии можно получить и разновидности растений, способных извлекать из почвы другие вредные вещества.

Преимущества биоремедиации заключаются в:

- наличию условий для проведения ремедиации *in situ*;
- относительно низкой себестоимости проводимых работ, по сравнению с традиционными очистными сооружениями;
- безопасности метода для окружающей среды;
- теоретической возможности экстракции ценных веществ из зеленой массы растений (Ni, Au, Cu);
- возможности мониторинга процесса очистки;
- высоком уровне очистки, который не уступает традиционным методам, особенно при небольшом объеме сточных вод (например, в сельской местности).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Расскажите об основной задаче экологической биотехнологии.
2. Какой ценный энергетический носитель образуется при переработке твердых отходов?

3. От чего зависит биокаталитический потенциал микробного сообщества свалок бытовых отходов?
4. Какие типы классификации сточных вод существуют?
5. Перечислите этапы очистки сточных вод и расскажите о них.
6. Какие виды микроорганизмов часто встречаются в сточных водах?
7. Что такое биофильтр и для чего он предназначен?
8. Расскажите об азотенке.
9. Что представляют собой окситенки и в каких случаях они используются?
10. Какие преимущества характерны для анаэробных процессов очистки сточных вод?
11. Какие методы используются при биоочистке газовоздушных выбросов?
12. Перечислите типы установок для биологической очистки воздуха.
13. Какие методы необходимо соблюдать для обеспечения стабильной работы биофильтров?
14. Почему биоскрубберы более эффективны для биологической очистки воздуха, чем биофильтры?
15. Какие задачи стоят перед биогеотехнологией?
16. Расскажите о биовыщелачивании металлов.
17. В каких случаях применяется поверхностное выщелачивание металлов?
18. Что происходит при обогащении руд и концентратов металлами?
19. Какие цели стоят перед биоэнергетикой?
20. Расскажите о биометаногенезе и его применении.
21. Какое сырье можно переработать с использованием биометаногенеза?
22. Перечислите установки, используемые для биометаногенеза.
23. Какова эффективность использования биогаза?
24. Дайте определение ксенобиотиков и назовите их наиболее распространенных представителей.
25. Какие методические подходы используются для удаления ксенобиотиков из окружающей среды?
26. Что такое биоремедиация и в каких случаях необходимо ее применение?
27. Перечислите преимущества биоремедиации, по сравнению с другими методами очистки почв.

Глава 9

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

9.1. Представления о нанотехнологиях

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

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

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

Наномир подразумевает мир объектов или связанных структур, имеющих характерные размеры от долей нанометра до сотен нанометров. Размеры нанообъектов — миллиардные доли метра. Например, размер атомов по порядку величины равен 0,1 нм; длины валентных связей и расстояния между атомами в кристаллических решетках — того же порядка; диаметр двуспиральной молекулы ДНК — 2 нм; тол-

щина клеточной мембраны — 6–10 нм; размеры вирусов — от 20 до 300 нм; характерные размеры молекул белков — от 10 до 100 нм. Минимальный размер углеродных нанотрубок, синтезированных в настоящее время, составляет 0,4 нм. Нижняя граница объектов, которыми занимается нанотехнология, определяется радиусом атома порядка 0,1 нм, верхняя — размерами до 0,1 мкм (100 нм), т. е. размерами биомолекул, при которых утрачивается специфика свойств и поведения наночастиц.

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

История использования нанотехнологий уходит корнями в глубокую древность: египтяне смешивали сажу с водой для изготовления так называемых китайских чернил, а скифы применяли магнитную жидкость Fe_3O_4 в виде красок. Опалесцирующие красные и рубиново-красные стекла Древнего Египта, Древнего Рима (кубок Ликурга) и витражей Средневековья (мастера Клауса Кункеля) можно также считать исторически первыми наноматериалами.

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

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

9.2. Нанотехнологии в медицине и биологии

Отрасль нанотехнологий и наноматериалов находит широкое применение в медицине (рис. 9.1). На сегодняшний день они применяются практически во всех ее отраслях, и особенно широко в генетике, гематологии, гигиене, токсикологии, микробиологии. Современные приложения нанотехнологий в медицине можно подразделить на несколько групп:



Рис. 9.1. Наночастицы на поверхности эритроцита

- наноструктурированные материалы, в том числе поверхности с нанорельефом, мембраны с нанотверстиями;
- наночастицы (в том числе фуллерены и дендримеры);
- микро- и нанокапсулы;
- нанотехнологические сенсоры и анализаторы;
- наноинструменты и наноманипуляторы;
- микро- и наноустройства различной степени автономности.

Продукты нанотехнологий используют в диагностике, мониторинге, при создании биосенсоров и сорбентов, а также в качестве протезов, имплантатов, искусственных органов чувств. В хирургии находят применение микро- и наноустройства различной степени автономности, зондовые микроскопы, наноинструменты и наноманипуляторы, в дерматологии — солнцезащитные кремы.

Рассмотрим более детально некоторые примеры применения нанотехнологий в *медицине*.

Наночастицы предполагается использовать как лекарственные препараты нового поколения, а также как *контейнеры для адресной доставки лекарств* в клетки-мишени. Например, лекарство можно сделать из порошка, состоящего из наночастиц с особыми свойствами. Эти частицы будут «проскакивать» через стенку сосуда или кишечную стенку и попадать к месту назначения быстрее, что сделает лечение более эффективным. Можно, «посадив» наночастицу на лекарство, превратить его в средство направленного действия, заставить «садиться» на ту ткань, которую необходимо разрушить (к примеру, опухоль) или, наоборот, защитить (например, сердце, печень). Таким образом, наночастицы позволят врачам доставлять лекарство точно к месту болезни, увеличивая тем самым эффективность лечения и минимизируя побочные эффекты. Применение наночастиц открывает также новые возможности для контролируемого вывода терапевтических веществ.

Мембраны с нанопорами могут применяться для фильтрации жидкостей организма от вредных веществ и вирусов, а миниатюрные *капсулы с нанопорами* — для доставки лекарственных средств в нужное место организма. Это дает возможность помещать в капсулы, например, инсулинпродуцирующие клетки животного, которые иначе были бы отторгнуты организмом.

Фуллереновые наносферы C₆₀ можно подобрать таким образом, чтобы связываться с заранее выбранными биологическими мишенями. Аддукт фуллерена с поливинилпирролидоном (ПВП) — это хорошо растворимое в воде соединение, а полости в его структуре близки по размерам молекулам C₆₀. Полости легко заполняются молекулами фуллерена, в результате получается продукт с высокой противовирусной активностью, превышающей таковую у ремантадина.

Микроскопические капсулы сравнительно простой конструкции могут взять на себя также дублирование и расширение естественных возможностей организма, как, например, *респирицит* — искусственный носитель кислорода и двуокиси

углерода, значительно превосходящий по своим возможностям и эритроциты крови, и существующие кровезаменители.

Наносферы применимы и в *диагностике*, например в качестве рентгеноконтрастного вещества, прикрепляющегося к поверхности определенных клеток и показывающего их расположение в организме. Кроме того, с помощью нанотехнологий можно определять даже одну молекулу какого-то вещества, к примеру антитела или вируса. Это гарантирует высокую точность проведения диагностики, ее массовость и одновременное определение нескольких (иногда десятков) компонентов, когда за один раз можно сделать много анализов.

Как и при любом типе диагностики, окончательная цель нанотехнологий состоит в том, чтобы помочь врачам идентифицировать заболевание как можно раньше, значительно улучшить качество постановки диагноза и лечение, в том числе и раковых образований.

Решение проблем *регенеративной медицины* имеет особое значение. В этом случае материалы с наноструктурированной поверхностью и предварительно заданными свойствами могут быть использованы для замены тех или иных тканей. Клетки организма опознают такие материалы как «свои» и прикрепляются к их поверхности. Преимуществами таких препаратов являются хорошая переносимость и отсутствие побочных эффектов, доступность и низкая цена.

В настоящее время достигнуты успехи в изготовлении наноматериалов, имитирующих естественную костную ткань. Нанокость применяется в ортопедии, нейрохирургии, отоларингологии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии, в том числе в качестве имплантатов для возмещения больших краниальных дефектов.

Представляет интерес и разработка наноматериалов, которые, наоборот, не позволяют клеткам прикрепляться к поверхности. Одной из сфер применения таких материалов могло бы стать изготовление биореакторов для выращивания стволовых клеток. Наночастицы могут использоваться для стимулирования врожденных механизмов регенерации. Основное внимание при этом сосредоточено на искусственной активации и управлении взрослыми стволовыми клет-

ками. Таким образом, применение материалов с наноразмерной структурой поверхности для управления процессами пролиферации и дифференциации стволовых клеток представляет собой огромное поле для исследований, в том числе и в области создания искусственных органов.

Ученые говорят также о возможности создания принципиально новых типов *перевязочных* и *клеяких материалов* с антимикробной, противовирусной и противовоспалительной активностью, дезинфектантов и антисептиков. В этом направлении уже достигнуты определенные результаты. Например, получены материалы с наночастицами серебра, обладающие антибактериальными свойствами. Они применимы в медицине (в виде красок, бесхлорных средств дезинфекции, перевязочных материалов, лака для покрытия катетеров и т. д.) для борьбы со стафилококками и другими бактериями.

Представляет интерес создание из наноматериалов *новых хирургических инструментов* с высокими режущими свойствами и износостойкостью.

На сегодняшний день возможно производство *магнитных жидкостей*. Сами по себе магнитные жидкости — это коллоидные дисперсии магнитных материалов размером от 5 нм до 10 мкм, которые могут применяться в терапии опухолей. Для этого магнитная частичка покрывается липидной оболочкой с добавлением лекарственного средства, затем вводится в кровь и под контролем магнитного поля направляется в место локализации патологического процесса. Эффективность действия обеспечивается высокой точностью (прицельностью) и возможностью создавать предельно высокие концентрации препарата в зоне опухоли.

Ведутся работы по использованию *магнитных наночастиц* в лечении прогрессирующих форм рака груди. Эти частицы крепятся к антителам, которые, попадая в кровеносную систему, распознают раковые клетки и прикрепляются к ним. Затем с помощью магнитного поля происходит их быстрый разогрев, который убивает клетки опухоли, не повреждая соседние ткани.

Другое важное направление использования нанотехнологий — создание *нановакцин* для профилактики и терапии

инфекционных заболеваний, против которых невозможно разработать вакцины традиционными методами. Таковыми являются вакцины для профилактики социально значимых инфекций (туберкулеза, гепатита В, вируса папилломы, вызывающего распространенное онкологическое заболевание) и особо опасных инфекций (лептоспироза, туляремии, бруцеллеза). Кроме того, до настоящего времени не удастся создать вакцину, защищающую одновременно от многих заболеваний.

Нановакцины имеют следующие преимущества:

— они практически безопасны, поскольку содержат только вакцинные компоненты;

— они нетоксичны, биосовместимы и биodeградируемы в организме;

— самосборка компонентов нановакцины решает проблему очистки, иммобилизации и концентрирования компонентов, обеспечивает стандартность получаемого продукта;

— технология нановакцин позволяет получать многокомпонентные препараты, защищающие одновременно от широкого спектра социально-значимых или особо опасных заболеваний.

В настоящее время изучается влияние *нанодисперсного кремнезема* на уменьшение токсичности факторов внешней среды. Доказано, что такой кремнезем понижает токсичность нитрита натрия, фторида натрия, доксорубицина, противотуберкулезных препаратов за счет связывания белков, снижения перекисного окисления, обезвреживания низкомолекулярных токсинов. На основе нанодисперсного кремнезема создан препарат с адсорбционно-детоксикационным действием, который показан при острых кишечных заболеваниях, вирусных гепатитах, атеросклерозе, острой почечной недостаточности, интоксикациях различного генеза, аллергических реакциях. Местно этот препарат применяют при гнойно-септических процессах, ранах; в стоматологии — для лечения гингивитов, стоматитов, пародонтита; в офтальмологии — в случае ожогов роговицы и воспалительных заболеваний глаз.

Выраженные противомикробные свойства проявляют *самособирающиеся пептидные нанотрубки* (например, *E. coli* погибает в течение часа). Метод основан на внедрении пеп-

тидных колец в мембрану бактерий, где они собираются в трубки, которые затем приводят к гибели бактерий. Прогнозируется, что самособирающиеся пептидные нанотрубки станут эффективным средством борьбы с микроорганизмами, устойчивыми к антибиотикам.

Таковы лишь некоторые приоритетные направления развития наномедицины.

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

Нанотехнологии применяют при стимуляции роста растений, лечении животных, для улучшения качества кормов.

Есть опыт внедрения нанотехнологий с целью уменьшения энергоемкости производства, оптимизации методов обработки сырья и увеличения выхода конечной продукции; создания новых упаковочных материалов, обеспечивающих долговую сохранность конечной продукции.

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

Отдельные проекты направлены на развитие более эффективных и средосберегающих *агротехнологий* (например, использование наноматериалов для очистки вод в агроэкосистемах или для переработки отходов *растениеводства* в этанол). В *животноводстве* разрабатывают методы использования нанодобавок в целях уменьшения доз росто-

вых факторов и гормонов, нейтрализации патогенов на ранних стадиях их контакта с животными.

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

Получены и успешно испытаны на животных эмульсии, содержащие *нанокapли*, которые обладают антивирусной и антимикробной активностью. Они способны обеззараживать поверхности, уничтожая не только сами микроорганизмы, но и споры, при этом оставаясь безвредными для животных клеток. Потенциально подобные эмульсии могут найти применение не только в медицине, но и в пищевой промышленности, для очистки воды и даже для защиты от бактериологического оружия.

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

Благодаря микро- и нанотехнологиям многократно повышается возможность обнаружения и анализа сверхмалых количеств различных веществ. Одним из вариантов такого рода устройств является *«лаборатория на чипе»*. Она представляет собой пластинку, на поверхности которой упорядоченно размещены рецепторы к нужным веществам, например антитела. Такое устройство способно обнаруживать

буквально отдельные молекулы и может быть использовано при определении последовательности оснований ДНК или аминокислот для целей идентификации, выявления генетических или онкологических заболеваний, обнаружения инфекционных возбудителей, а также токсических веществ.

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

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

Уже нашли применение такие достижения нанотехнологий, как:

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

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

Несмотря на риски и проблемы, связанные с нанотехнологиями, предполагается, что наноустройства смогут полностью заменить существующие промышленные и сельскохозяйственные технологии, во много раз превзойти их по производительности при одновременном снижении затрат. Ученые прогнозируют возможность встраивания в клетки крови датчиков, реагирующих на появление радионуклидов в окру-

жающей среде и раковых клеток в организме, а также создание сверхчувствительных сенсоров и «умной» косметики, новых видов топлива и материалов для полетов в космос.

9.3. Основные направления развития нанобиотехнологии

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

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

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

Наномеханизмы. Этот подход представляется наиболее фантастическим, но и наиболее перспективным. Основное внимание уделяется конструкциям из атомов углерода, что обусловлено его способностью образовывать огромное коли-

чество разнообразных соединений, а также рекордной прочностью связи между двумя атомами углерода. Примерами углеродных молекул, которые могут послужить прототипами нанотехнологических компонентов, являются фуллерены-шары и нанотрубки из пяти- или шестиугольных колец атомов углерода. Из углерода возможно изготовить молекулы, имеющие форму самых разнообразных деталей — шестеренок, штоков, подшипников и т. д. Устройство для такой сборки наномеханизмов называется *ассемблером*.

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

9.4. Возможные риски, связанные с использованием нанобиотехнологий

Ученые говорят не только о возможных выгодах применения нанотехнологий, но и о возможных рисках. Даже специалисты обращают внимание на отсутствие «порога» действия наноматериалов и значительные выбросы при их производстве. Существуют также политические и этические аспекты (например, разработка новых видов вооружения, неоправданное применение наноструктур).

Говоря о создании новых материалов, не следует забывать о том, что это еще и риск для здоровья человека и окружающей среды. Ведь наночастицы легко проникают через кожу,

дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, взаимодействуют друг с другом, приобретая тем самым неизвестные свойства. Поэтому переход от микро- к нанотехнологиям требует специальных фундаментальных исследований.

Дело в том, что наноматериалы могут обладать огромной разрушительной силой. К примеру, ученые проводили опыты с углеродом и наноуглеродом. Когда в аквариум с рыбками бросили угольный порошок, он просто осел и рыбки продолжали плавать. Но после добавления наноуглерода все рыбки погибли, потому что он проникает в мозг и блокирует нервные клетки.

Наномедицина и нанотехнология — новые области, и существует не много экспериментальных данных о непреднамеренных и неблагоприятных эффектах. Нехватка знаний о том, как наночастицы будут встраиваться в биохимические процессы в человеческом теле, доставляет особое беспокойство.

Из сказанного очевидно, что должна быть разработана программа по биобезопасности наноматериалов, которая включала бы в себя основные проблемы, связанные с их разработкой, применением и утилизацией.

Первая проблема — обеспечение безопасности труда при производстве наноматериалов. Предполагается, что на работе во вредных условиях будет занято около 400 тыс. человек, а соответствующие правила техники безопасности пока отсутствуют.

Вторая проблема — охрана наносубстанций. Как и в случае с любыми экологически опасными и потенциально опасными веществами, возникает проблема их утилизации, в том числе утилизации nanoотходов, просроченных лекарств и гигиенических средств, созданных с применением нанотехнологий.

Третья проблема — необходимость контроля качества продукции, особенно лекарств и биоактивных добавок.

Таким образом, очень важно изучить фундаментальные закономерности проявления биологических и токсических эффектов наночастиц, в зависимости от их формы, размера, исходного материала, площади поверхности, заряда и дру-

гих физико-химических особенностей строения, а также от дозы, путей введения, концентрации в области органа-мишени и продолжительности воздействия. Необходимо правильно оценить возможные отдаленные риски и эффекты нанотерапии.

Приведем одно из мнений ученых в поддержку нанотехнологий: «Мы не смогли предотвратить создание ядерного оружия; не остановили рентгеновские лучи; мы применяем одни и те же препараты и в качестве яда, и в качестве противоядия, меняя дозировку, поэтому взять позитив наноматериалов и нанотехнологий мы просто обязаны».

Биологическая нанотехнология — одно из наиболее спорных, но и едва ли не наиболее многообещающих направлений в современной науке. Вопрос о реализации ее идей будет, вероятно, решен в течение ближайших десятилетий, а возможно, и раньше.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы размеры объектов, используемых в нанотехнологиях?
2. Какие виды нанотехнологий являются самыми древними?
3. Расскажите об использовании нанотехнологий в медицине.
4. Какие нанотехнологии используются в сельском хозяйстве?
5. Что такое лаборатория на чипе?
6. Расскажите об использовании наноманипуляторов.
7. Какие риски могут возникнуть при использовании достижений нанотехнологий?

Глава 10

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ И ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОНТРОЛЬ

10.1. Введение

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

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

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

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

Различные требования, предъявляемые в разных странах к ГМ-продуктам, и колоссальная разница между посе-

Общая площадь под трансгенными культурами, млн га (1996–2003)



Рис. 10.1. Карта мира с общими площадями под трансгенными культурами, млн га

ными площадями, занимаемыми генетически модифицированными растениями в различных регионах (рис. 10.1), свидетельствуют о том, что проблема очень далека от окончательного решения. Мировая динамика роста площадей возделывания трансгенных культур поражает своим размахом: с 1996 по 2003 г. они выросли в 40 раз (с 1,7 до 67,7 млн гектаров). Лидерами являются США, Аргентина, Канада. Мировые продажи трансгенных растений (в основном сои, хлопка, кукурузы, рапса) увеличились с 75 млн долларов в 1995 г. до примерно 8 млрд долларов в 2005 г. (табл. 5).

В 2004 г. в Аргентине было произведено 34,5 млн тонн генетически модифицированной сои, т. е. 49,5 % всех выращенных здесь зерновых, а под ее посевами было занято 14 млн га, т. е. 54 % всех посевных площадей страны. Таким образом, генетически модифицированная соя стала основной сельскохозяйственной культурой Аргентины. При этом если в США только 40 % выращиваемой сои является трансгенной, то в Аргентине этот показатель равен 99 %.

**Посевные площади в некоторых странах мира,
занятые трансгенными культурами в 2006 г., млн га**

Страна	Площадь	Генетически модифицированные растения
США	54,6	Соя, кукуруза, хлопчатник, рапс (канола), папайя, люцерна
Аргентина	18,0	Соя, кукуруза, хлопчатник
Бразилия	11,5	Соя, хлопчатник
Канада	6,1	Канола, кукуруза, соя
Индия	3,8	Хлопчатник
Китай	3,5	Хлопчатник
Парагвай	2,0	Соя
Южная Африка	1,4	Кукуруза, соя, хлопчатник
Уругвай	0,4	Соя, кукуруза
Филиппины	0,2	Кукуруза
Австралия	0,2	Хлопчатник
Румыния	0,1	Соя
Мексика	0,1	Хлопчатник, соя
Испания	0,1	Кукуруза
Колумбия	<0,1	Хлопчатник
Франция	<0,1	Кукуруза
Иран	<0,1	Рис
Гондурас	<0,1	Кукуруза
Чехия	<0,1	Кукуруза
Португалия	<0,1	Кукуруза
Германия	<0,1	Кукуруза
Словакия	<0,1	Кукуруза

По данным российского Федерального реестра пищевой продукции, на 26 февраля 2001 г. в нашей стране был зарегистрирован и допущен к использованию на внутреннем рынке 81 вид трансгенного пищевого сырья. Практически все из них являются производными сои. В 2004 г. службами Госсанэпиднадзора Российской Федерации были обнаружены трансгенные соевые добавки в 17,7 % исследованных мясных продуктов и в 16,7 % хлебулочных и крупяных изделий.

Хлынувший в Россию поток продуктов, содержащих трансгенные компоненты, в условиях неоднозначности результатов исследований в области их медицинской и экологической безопасности ставит ряд задач. Во-первых, необходимы анализ и оценка мотивов разработки, производства и использования генетически модифицированных продуктов питания. Во-вторых, не проработана российская правовая база, регламентирующая использование таких продуктов.

10.2. Международная законодательная база по биобезопасности и ее реализация

Международное сообщество приняло ряд документов, определяющих правила безопасности при работе с генетически измененными организмами. Это **Картахенский протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии** (регулирует перемещение ГМО), **Декларация Рио** (определяет, что доказательства безвредности ГМ-продуктов лежат на производителе продукции), документы **Кодекса Алиментариус** и **Комиссии ООН по пищевым стандартам** (определяют стандарты для ГМ-продуктов), а также **Директивы Европейского Парламента и Совета** (определяют методы оценки угрозы, правила мониторинга, а также условия, при которых выдаются разрешения на выпуск ГМО). Разработка и принятие этих документов сопровождаются ожесточенной борьбой между производителями ГМ-продуктов и экологами.

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

Различные страны при этом по-разному воплощают в свое законодательство положения о мерах предосторожност-

ти и формах контроля за ГМ-продуктами. В США, например, нет особых законов, определяющих критерии безопасности трансгенных продуктов. Для всех продуктов питания они являются общими («Закон о пищевых продуктах и косметических препаратах»).

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

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

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

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

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

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

Наконец, **Директива Европейского Парламента и Совета от 22.09.2003 № 1829/2003** о генетически модифицированных продуктах и кормах ввела с апреля 2004 г. новые правила маркировки ГМ-продуктов в странах Евросоюза. Маркировке подлежит вся пищевая продукция, полученная с использованием ГМ-продуктов при их содержании более 0,9 %.

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

10.3. Законодательная база России по биобезопасности и ее реализация

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

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

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

повышение эффективности сельского хозяйства» и др.

При этом указывается: «Генно-инженерная деятельность должна основываться на следующих принципах:

безопасности граждан (физических лиц) и окружающей среды;

<...>

общедоступности сведений о безопасности генно-инженерной деятельности;

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

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

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

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

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

по проблемам генно-инженерной деятельности». Комиссия разработала Временные правила безопасного получения, использования и передачи генетически модифицированных (трансгенных) растений и их фрагментов, содержащих рекомбинантную ДНК. Полный цикл предполагает испытание биологической безопасности, экологическую экспертизу, широкомасштабный выпуск. Постановлением Правительства РФ от 16.02.2001 № 120 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов» утверждено Положение о государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов. Установлено, что генно-инженерно-модифицированные организмы, предназначенные для первого на территории Российской Федерации выпуска в окружающую среду, промышленного использования или импорта, подлежат обязательной государственной регистрации. Регистрация таких организмов и ведение сводного государственного реестра зарегистрированных генно-инженерно-модифицированных организмов возложены на Министерство промышленности, науки и технологий РФ.

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

Положением утвержден также срок действия свидетельства о государственной регистрации модифицированного организма — до пяти лет с момента включения его в реестр. Срок действия свидетельства может быть продлен — по заявлению его владельца — на следующие пять лет. При появлении в период срока действия свидетельства о государственной регистрации модифицированного организма новых научно обоснованных данных о биобезопасности модифицированного организма (в сравнении с исходным немодифицированным организмом) Министерство промышленности, науки и технологий РФ может — по представлению экспертного совета — принять решение о его перерегистрации без проведения экспертизы. В случае выявления негативного воздействия модифицированного организма на ок-

ружающую среду, подтвержденного экспертизой, проведенной в соответствии с указанным выше Положением, по инициативе федеральных органов исполнительной власти, органов местного самоуправления, заинтересованных организаций и граждан государственная регистрация модифицированного организма может быть аннулирована.

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

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

В 2000 г. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 08.11.2000 № 14 введены Положение о порядке проведения санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников, а также Методические указания «Медико-биологическая оценка пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников». В соответствии с этими документами экспертиза осуществляется по трем направлениям: медико-генетическая оценка (Центр «Биоинженерия» РАН), медико-биологическая оценка (ГУ НИИ питания РАМН) и оценка технологических параметров продукта (МГУ прикладной биотех-

нологии Минобразования России). Результаты проведенной экспертизы представляются в Минздрав России, который выдает разрешение на использование ГМИ в пищевой промышленности и реализацию населению или мотивированный отказ.

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

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

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

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

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

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

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

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

— 3 сорта картофеля, устойчивые к колорадскому жуку (Рассет, Бурбанк Ньюлиив и Супериор Ньюлиив);

— 1 линия сахарной свеклы, устойчивая к глифосату;

— 1 линия риса, устойчивая к глюфосинату аммония;

— 5 видов генетически модифицированных микроорганизмов.

В этой связи уместно остановиться на проблеме маркировки продуктов, содержащих ГМИ. В мире существуют различные подходы к маркировке пищевых продуктов. Так, в США, Канаде и Аргентине такие продукты не маркируются каким-либо особым образом; в Японии и Австралии принят 5%-й уровень содержания ГМИ в продуктах, обязательный для маркировки, в странах Евросоюза — 0,9 %-й.

Система маркировки пищевой продукции из ГМИ существует в России с 1999 г. Однако она носила рекомендательный характер. В соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормами СанПиН 2.3.2.1078-01

«Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», с 1 сентября 2002 г. была введена обязательная маркировка пищевых продуктов, полученных с применением ГМО. Маркировке подлежала вся пищевая продукция, содержащая в своем составе более 5 % трансгенных компонентов.

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

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

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

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

Несмотря на распоряжения Госсанэпиднадзора, как показали проверки в супермаркетах и магазинах, маркируется только ничтожная часть ГМ-продуктов. При этом уровень ГМИ в них превышает не только 0,9 % (установленную норму), но даже 50 % и выше. Даже если товар маркирован, не каждый рядовой потребитель знает, что значок «ARDEX F» означает присутствие изолята (концен-

трата) соевого белка. Россияне лишены еще одной подсказки на наличие ГМ-продуктов: во всем мире продукты из ГМ-сырья дешевле натуральных, а в России они продаются по цене натуральных.

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

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

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

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

Одной из основных задач в области предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в результате воздействия биологических факторов является обеспечение безопасности продуктов питания, производимых из генетически модифицированных источников, а также бе-

зопасности экологической системы от проникновения чужеродных биологических видов организмов; прогнозирование генетических аспектов биологической безопасности и создание системы государственного контроля за оборотом генетически модифицированных материалов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. В чем сущность понятия «биологическая безопасность»?
2. Перечислите современные источники биологической опасности.
3. Определите место биотехнологии в вопросах биобезопасности.
4. Какие международные документы создают нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии?
5. Приведите данные о расширении площадей возделывания трансгенных культур в мире.
6. Какие вопросы рассматривает международная Конвенция о биологическом разнообразии?
7. Расскажите о законодательной базе России по биобезопасности.
8. По каким направлениям проводится экспертиза генетически модифицированных продуктов для их использования в пищевых целях?
9. Рассмотрите возможности и перспективы применения генетически модифицированных организмов (ГМО) в России и в мире.
10. Почему современные технологии создания ГМО служат источником биологических и экологических рисков?
11. В чем состоит перспектива появления суперсорняков и суперустойчивых насекомых?
12. Объясните понятие «отсроченное действие ГМ-растений».
13. Приведите примеры достижений генетической инженерии в области фундаментальных наук.
14. Расскажите о достижениях генетической инженерии в области медицины.
15. Перечислите основные законы РФ по контролю безопасности ГМО. В чем их смысл?
16. Сравните технологии генетической и клеточной инженерии.
17. В чем сущность понятия «биологическая этика» применительно к биотехнологии?

ПРИЛОЖЕНИЯ

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Лабораторная работа № 1

Получение накопительных культур сенной и картофельной палочек

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

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

Оборудование и материалы: чашки Петри, конические колбы, ножницы, мел, вата, фильтровальная бумага, электроплитка.

Объект исследования: сено, клубни картофеля.

Ход работы.

Получение культуры сенной палочки (Bacillus subtilis)

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

Через двое суток на поверхности среды развивается беловатая пленка *Bacillus subtilis*, которая при старении на третьи-четвертые сутки становится серовато-зеленоватой.

Другие микроорганизмы при этом вырастают редко и в небольших количествах.

Получение культуры картофельной палочки (Bacillus subtilis var mesentericus)

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

Задание. Отметить интенсивность развития культур микроорганизмов, просмотреть их под микроскопом и зарисовать.

Лабораторная работа № 2

Антагонизм микроорганизмов

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

Цель работы: исследовать антагонистические отношения между различными группами микроорганизмов.

Оборудование и материалы: чашки Петри с мясо-пептонным агаром, микробиологические петли, спиртовка.

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

Ход работы.

На поверхность застывшего мясо-пептонного агара, находящегося в чашке Петри, микробиологической петлей наносят широкую полосу культуры *Bac. subtilis*, перпендикулярно к ней параллельными штрихами высевают культуры *Bac. cereus* и *Sarcina lutea*. Чашки помещают в

термостат при температуре 25–28 °С. Через неделю наблюдают результаты опыта. *Bac. subtilis* является антагонистом по отношению к двум другим микроорганизмам, поэтому в непосредственной близости от культуры не будет роста обеих бактерий, на некотором удалении наблюдается слабый рост и лишь на значительном расстоянии рост культур окажется нормальным.

Задание. Результаты опытов занести в таблицу и зарисовать. Сделать выводы о взаимоотношениях различных микроорганизмов, находящихся в одной и той же среде.

Лабораторная работа № 3

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Широкое использование антибиотиков в рационе животных, а также для профилактики и лечения болезней привело к появлению резистентных (устойчивых) форм микроорганизмов. Для того чтобы определить наличие чувствительности бактерий, используют метод бумажных дисков, пропитанных антибиотиками.

Предпочтительнее использовать антибиотики тетрациклинового комплекса, широко применяемые при выпаивании телят, кормлении взрослых животных.

Метод основан на диффузии антибиотика из пропитанного им диска фильтровальной бумаги в плотную питательную среду. Содержание большинства антибиотиков в дисках колеблется от 1 до 50 мкг.

Цель работы: определить чувствительность микроорганизмов к различным антибиотикам.

Оборудование и материалы: чашки Петри с мясо-пептонным агаром; микробиологические петли; диски из фильтровальной бумаги, пропитанные различными растворами антибиотиков; стеклянный шпатель; пипетки; спиртовка.

Объект исследования: чистые культуры микроорганизмов (можно использовать культуры из предыдущей работы — *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*).

Ход работы.

В стерильные, предварительно просушенные чашки Петри разливают по 10 мл мясо-пептонного агара. На по-

верхность среды высевают суспензию суточной культуры микроорганизмов. Пипеткой берут 0,02 мл этой суспензии (одна капля) и стерильным шпателем растирают досуха на питательной среде в чашке Петри у пламени горелки.

Затем стерильным пинцетом раскладывают диски фильтровальной бумаги диаметром 8 мм, предварительно пропитанные разными антибиотиками (не менее четырех-пяти дисков). Чашки Петри выдерживают 30 мин при комнатной температуре для диффузии препаратов в среду. Затем чашки помещают в термостат при 37 °С на 18–24 ч.

При оценке результатов опыта измеряют диаметр задержки роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками, включая диаметр самих дисков. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизма означает, что испытуемый штамм устойчив к данному препарату. Зоны диаметром до 10 мм указывают на малую чувствительность, зоны диаметром более 10 мм — на чувствительность микроорганизма.

Задание. Результаты опыта записать в таблицу. Сделать выводы о чувствительности различных микроорганизмов к антибиотикам.

Лабораторная работа № 4

Определение чувствительности микроорганизмов к различным фитонцидам

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

Цель работы: выяснить чувствительность микроорганизмов к действию различных фитонцидов.

Оборудование и материалы: чашки Петри с мясо-пептонным агаром (МПА), микробиологические петли, чеснок, репчатый лук, хрен, редька, лимон, стеклянный шпатель, пипетки, спиртовка.

Объект исследования: чистые культуры микроорганизмов (можно использовать культуры из предыдущей работы — *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*).

Ход работы.

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

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

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

Задание. Результаты опыта записать в таблицу и зарисовать. Сделать выводы о чувствительности различных микроорганизмов к фитонцидам.

Лабораторная работа № 5

Культура плесневого гриба на полной и неполной питательных средах

Для изучения особенностей питания микроорганизмов удобным модельным объектом является *Aspergillus niger*, который легко получить и использовать в постановке различных экспериментов, в том числе для определения значения отдельных минеральных элементов для роста.

Цель работы: изучить значение питательных элементов для роста гриба *Aspergillus niger*.

Оборудование и материалы: 20%-й раствор сахарозы; 1%-е растворы $ZnSO_4$, H_3BO_3 , $MnSO_4$; 10%-е растворы NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , KCl , NaH_2PO_4 , $MgSO_4$, $MgCl_2$, $FeSO_4$,

FeCl_3 , Na_2SO_4 ; колбы емкостью 100 мл; цилиндры емкостью 100 мл; пипетки на 10 и 1 мл; препаровальные иглы; вата.

Объект исследования: культура гриба *Aspergillus niger*.

Ход работы.

Готовят различные питательные среды для культивирования гриба *Aspergillus niger*.

Вариант 1 — полная питательная среда без микроэлементов, %: сахароза — 10,0; NH_4NO_3 — 0,3; KH_2PO_4 — 0,2; MgSO_4 — 0,05; FeSO_4 — 0,01.

Вариант 2 — среда без углерода: исключена сахароза. Для компенсации осмотической активности среды можно внести соответствующее по осмотическому эквиваленту количество хлорида натрия (NaCl), который не оказывает влияния на развитие гриба.

Вариант 3 — среда без азота: исключен NH_4NO_3 .

Вариант 4 — среда без фосфора: KH_2PO_4 заменен эквивалентным количеством KCl .

Вариант 5 — среда без калия: KH_2PO_4 заменен эквивалентным количеством NaH_2PO_4 .

Вариант 6 — среда без серы: MgSO_4 и FeSO_4 заменены эквивалентными количествами MgCl_2 и FeCl_3 .

Вариант 7 — среда без магния: MgSO_4 заменен эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

Вариант 8 — среда без железа: FeSO_4 заменен эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

Вариант 9 — полная питательная среда с добавлением цинка: ZnSO_4 — 0,01 %.

Вариант 10 — полная питательная среда с добавлением марганца: MnSO_4 — 0,01 %.

Вариант 11 — полная питательная среда с добавлением бора: H_3BO_3 — 0,01 %.

Следует рассчитать эквивалентный процент замещающего вещества (это относится ко всем вариантам, за исключением первых трех). Если в каждом из этих вариантов исключить какую-либо соль, то одновременно удаляются два элемента питания вместо одного. Так, в варианте № 4 (среда без фосфора) при удалении KH_2PO_4 одновременно исключаются фосфор и калий. Поэтому калий необходимо внести

в среду в эквивалентном количестве в виде KCl . Кроме того, необходимо помнить, что *Aspergillus niger* аэробный организм, поэтому для создания оптимальных условий аэрации используют колбы емкостью 100 мл с 30 мл среды.

Пример расчета.

Вариант 4 — среда без фосфора: KH_2PO_4 (0,2 % в среде) заменяют на KCl .

Молекулярная масса KH_2PO_4 — 136, KCl — 74.

Сначала определяют содержание (в %) калия (X) в среде:

136 г KH_2PO_4 составляют 0,2 %;

39 г K — X %;

$X = 0,06$ %.

Затем устанавливают количество KCl (в %), эквивалентное изъятому количеству KH_2PO_4 :

39 г K соответствуют 0,06 % K ;

74 г — Y % KCl ;

$Y = 0,1$ %.

Далее рассчитывают количество каждого вещества в граммах в 30 мл среды, зная их процентное содержание.

Пример расчета.

Необходим раствор, концентрация NH_4NO_3 в котором 0,3 %:

в 100 мл раствора содержится 0,3 г NH_4NO_3 ;

в 30 мл — X г NH_4NO_3 ;

$X = 0,09$ г.

Таким же образом рассчитывают навески всех остальных компонентов среды.

Так как навески в большинстве своем очень малы, что затрудняет взвешивание, удобнее использовать готовые растворы: 20%-й раствор сахарозы; 1%-й раствор микроэлементов; 10%-е растворы всех остальных солей. Для этого следует определить, сколько миллилитров каждого раствора надо взять, чтобы внести соответствующую навеску.

Пример расчета.

Для NH_4NO_3 :

в 10 мл 10%-го раствора NH_4NO_3 содержится 10 г NH_4NO_3 ;

в Y мл 10%-го раствора NH_4NO_3 — 0,09 г NH_4NO_3 ;

$Y = 0,9$ мл.

Подобным же образом рассчитывают (в мл) все ингредиенты для каждого варианта и вносят их в колбу.

Просуммировав объемы растворов в каждом варианте, вычтя полученные суммы из 30 мл, получают количество дистиллированной воды, которое необходимо добавить в каждую колбу.

Колбы со средой заражают спорами гриба *Aspergillus niger*, закрывают ватными пробками и подписывают варианты опыта.

Среды перед внесением спор гриба не стерилизуют, так как высокая концентрация сахара и кислая реакция среды за счет кислых солей калия, магния и железа препятствуют росту бактерий.

Для каждого варианта опыт желательно повторить дважды. Опытные колбы помещают в термостат при 28–30 °С.

Материал анализируют через семь дней, так как к этому времени гриб вполне разовьется. Пленка, выросшая в первом варианте, принимается в качестве образца, с ней сравнивают все остальные. Обычно в этом варианте рост гриба очень хороший. Рост гриба оценивают визуально.

Отмечают состояние культуры гриба:

а) характер мицелия — сплошная пленка или островками, плотная или студенистая, складчатая или гладкая;

б) спороношение — обильное или слабое, зрелые или незрелые спорангии.

Для более точной оценки пленку гриба тщательно промывают с нижней стороны водой. Затем пленку из каждого варианта опыта можно высушить в сушильном шкафу при 105 °С до постоянной массы и взвесить, принимая вес пленки гриба в первом варианте за 100 %.

На средах, где исключен тот или иной элемент питания (особенно при большой потребности в нем) гриб не растет или растет очень слабо. При полном удалении из питательной среды необходимого элемента гриб развиваться не будет.

Задание. Результаты опыта записать в таблицу и зарисовать. Сделать выводы о необходимости различных питательных элементов для нормального роста гриба *Aspergillus niger* и об особенностях развития гриба в отсутствие и при дополнительном внесении какого-либо элемента питания.

Лабораторная работа № 6

Образование лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger*

В биотехнологии широко используется получение лимонной кислоты с помощью микроорганизмов. Этим важным свойством обладает и гриб *Aspergillus niger*.

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

Оборудование и материалы: 20%-й раствор сахарозы; 10%-е растворы NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 ; колбы емкостью 100 мл; цилиндры емкостью 100 мл; пипетки на 10 и 1 мл; препаровальные иглы; вата.

Объект исследования: культура гриба *Aspergillus niger*.

Ход работы.

Готовят 200 мл полной питательной среды без микроэлементов, %: сахароза — 10,0; NH_4NO_3 — 0,3; KH_2PO_4 — 0,2; MgSO_4 — 0,05; FeSO_4 — 0,01.

Определяют исходную кислотность раствора с помощью рН-метра.

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

Во все колбочки вносят равное количество спор гриба. Колбы подписывают и ставят в термостат при 28–30 °С.

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

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

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

В результате этой работы могут быть получены следующие данные.

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

Задание. Результаты опыта записать в таблицу и зарисовать. Сделать выводы об образовании лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger* в различных условиях.

Лабораторная работа № 7

Получение каллусной ткани из листьев табака

Для растения *in vivo* каллус — это группа клеток, возникающая при травмах и защищающая место поранения (раневая паренхима). В ней накапливаются питательные вещества для регенерации анатомических структур или утраченного органа. На питательных средах с большим содержанием ауксинов (2,4-Д) клетки экспланта дедифференцируются. Клетки утрачивают прежние функции и морфологию. Особенности дедифференциации клеток экспланта зависят от генетики экспланта. Причем чем менее дифференцирована клетка, тем легче получить каллус. Дедифференциация специализированных клеток начинается с обогащения их элементами цитоплазмы: микротрубочками, мембранами ЭПС и комплекса Гольджи, рибосомами; исчезают хлоро- и хромопласты, продукты их деятельности; может образоваться много ядер или увеличиться число хромосом; укрупняются вакуоли. Каллус, выращиваемый поверхностным способом, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющую строго определенной структуры. Клетки каллуса либо бесцветны, либо имеют желтоватый оттенок. В зависимости от проис-

хождения и условий культивирования, различают каллусы: рыхлые, с сильно оводненными, легко отделяющимися друг от друга клетками; средней плотности, с зонами меристематической активности; плотные, с зонами редуцированного камбия и сосудов.

В биотехнологии чаще всего используют те виды растений, которые и в обычных условиях легко укореняются, регенерируют, образуют каллус. Клетки табака легко дифференцируются и переходят к делению, образуя быстрорастущую каллусную ткань. Поэтому большинство методов получения и культивирования каллуса разработано для табака. Каллусы можно получить практически из любой части растения. Для культивирования каллусов из листьев табака используют среду Мурасиге — Скуга (МС) с добавлением ауксинов (2,4-Д).

Цель работы: освоить метод приготовления питательной среды для получения каллусной культуры табака.

Оборудование и материалы: чашки Петри со стерильной питательной средой МС для индукций каллусогенеза, 6% -й раствор хлорамина, колбы со стерильной дистиллированной водой.

Объект исследования: растения табака.

Таблица 1

Приготовление маточных растворов для среды Мурасиге — Скуга (МС)

Компоненты среды	Количество вещества
Маточный раствор макроэлементов (г на 1 л маточного раствора)	
KNO_3	38
NH_4NO_3	33
KH_2PO_4	3,4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,4
или $MgSO_4$ безводный	3,6
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	8,8
или $CaCl_2$ безводный	6,65

Компоненты среды	Количество вещества
Маточный раствор микросолей (мг на 100 мл маточного раствора)	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
H_3BO_3	620
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2410
или $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860
KJ	83
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5
FeSO_4	557
Na_2 ЭДТА	745

Таблица 2

**Среда Мурасиге — Скуга (МС) для клеточных
и тканевых культур**

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl_2	5 мл/л
Тиамин-НСl	1 мг/л
Пиридоксин-НСl	0,5 мг/л
Никотиновая кислота	0,5 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
Глицин	2 мг/л
Сахароза	30 г/л
Агар-агар	7 г/л
рН 5,6–5,8	

Ход работы.

Приготовить питательные среды МС с добавлением: а) 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л БАП; б) 1,0 мг/л ИУК + 0,2 мг/л БАИ. Листья табака поместить в дезинфицирующий раствор на 5 мин, затем промыть стерильной дистиллированной водой три раза.

Стерильным скальпелем вырезать сегменты у основания листа ближе к центральной жилке длиной 1,5–2 см, шириной 1 см. Для лучшего каллусообразования делают насечки по всей поверхности сегмента. Поместить экспланты на питательные среды (перед каждой манипуляцией инструменты обрабатывать спиртом и обжигать на пламени спиртовки). Чашки Петри с эксплантами перенести в термостат для индукции каллусогенеза при температуре 25 °С.

Задание. Результаты опыта рассмотреть через две — четыре недели, зарисовать, сравнить каллус, полученный на среде с ИУК, с каллусом, полученным в среде с 2,4-Д. Сделать выводы.

Лабораторная работа № 8**Получение каллусов из незрелых зародышей и узлов кущения пшеницы**

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

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

Оборудование и материалы: ламинар-бокс, пробирки с питательной средой МС, 6% -й раствор хлорамина,

стерильная дистиллированная вода, препаровальные иглы, пинцеты, скальпели, стерильная бумага, флаконы с 96% -м спиртом, спиртовка.

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

Ход работы.

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

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

Задание. Через две — четыре недели рассмотреть каллусные клетки под микроскопом и зарисовать, сделать выводы о морфологии каллусов.

Лабораторная работа № 9

Получение каллусов из корешков фасоли

Каллусы можно получать из разных частей растения, в том числе из кончиков корней. Образование каллуса происходит в области первичных и вторичных меристем. Процесс каллусообразования зависит от размера экспланта. Оптимальная величина экспланта 5–10 мм³, масса 20–100 мг. Многие ткани имеют физиологическую полярность. Поэтому каллус лучше образуется на той стороне экспланта, которая ближе к апикальным меристемам корня. Кончики корней легко образуют каллус, если они помещены на среду горизонтально, тогда как сегменты стебля лучше формируют каллус, если их поместить вертикально. Для культивирования на питательных средах лучше использовать сте-

рильные корешки, полученные при проращивании семян в стерильных условиях.

Цель работы: получить каллус из корешков фасоли.

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

Объект исследования: семена фасоли.

Ход работы.

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

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

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

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

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

Лабораторная работа № 10

Субкультивирование каллусов

В цикле выращивания каллусные клетки после ряда делений проходят обычный онтогенез: растут растяжением,

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

Цель работы: исследовать характер роста каллуса картофеля.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс, пробирки с питательной средой для культивирования каллусов, препаровальные иглы, пинцеты, флакон с 96%-м спиртом, спиртовка.

Объект исследования: каллусная культура клеток картофеля.

Ход работы.

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

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

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

$$\text{ИР} = (m_2 - m_1) : m_1 \times 100 \%,$$

где ИР — интенсивность роста; m_1 — масса каллусной ткани в начале пассажа; m_2 — масса каллусной ткани в конце пассажа.

Лабораторная работа № 11

Получение и культивирование суспензии картофеля на средах с различными гормонами

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

зионные культуры имеют большое значение для генетики и особенно молекулярной биологии: из суспензионных клеток получают протопласты, необходимые для соматической гибридизации, генетической инженерии, а также для изучения метаболизма клеток.

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

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

Объект исследования: пробирки с рыхлыми каллусами картофеля.

Ход работы.

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

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

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

Задание. Результаты культивирования суспензии зарисовать и сделать выводы о влиянии различных по составу сред на образование суспензионной культуры.

Лабораторная работа № 12

Определение плотности суспензионной культуры и оценка ее ростовой активности

По плотности суспензии можно не только охарактеризовать состояние клеточной популяции, но и определить время



a



б



в

Рис. 3.1. Культуры высших растений *in vitro* (по Л.А. Лутовой, 2000):
a — калусная культура;
б — морфогенная культура;
в — регенерация листовых побегов

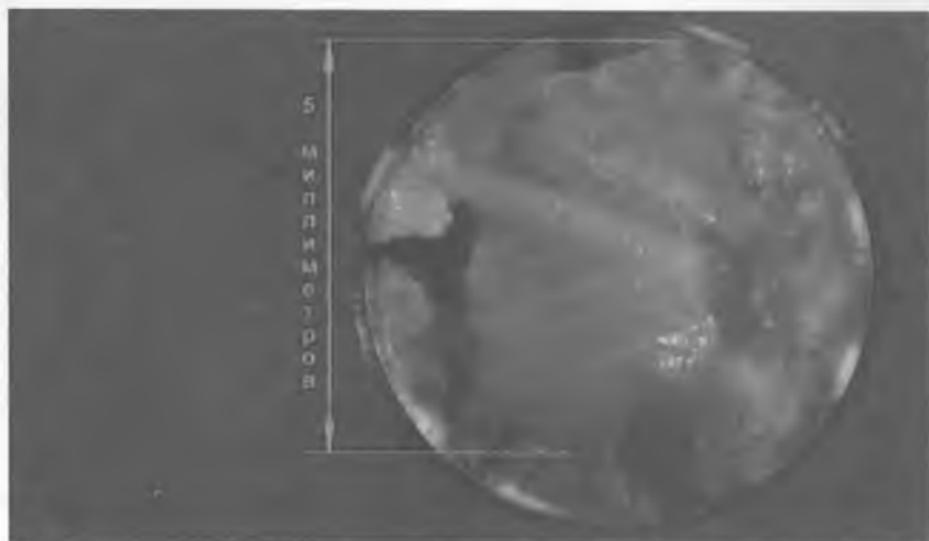


Рис. 3.3. Инициация калусных клеток на растительном экспланте



Рис. 3.5. Формирование каллуса на сегменте растительной ткани тиса



Рис. 3.6. Каллусная культура чайного растения, имеющая на поверхности темноокрашенные некротические участки



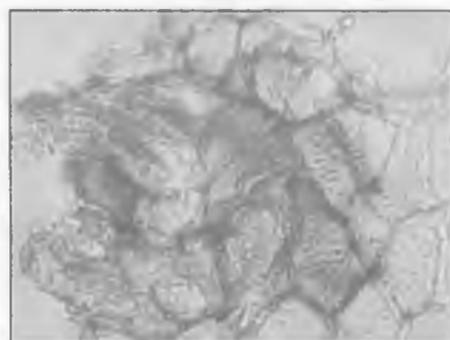
а



б



в



г

Рис. 3.8. Различная морфология каллусных культур высших растений: *а* — рыхлая каллусная ткань чайного растения; *б* — каллусная ткань рододендрона средней плотности; *в* — плотная каллусная ткань чайного растения, в структуре которой формируются трахеидальные элементы — *г*



a



b

Рис. 3.9. Суспензионные культуры льна в условиях *in vitro*:
a — крупноагрегированная;
b — мелкоагрегированная (одиночные клетки)

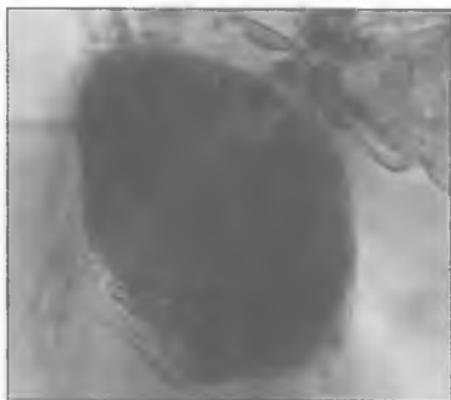


Рис. 3.12. Клетка —
 вместилище (эпибласт)
 с фенольными соединениями
 из калусной культуры
 чайного растения



a



б

Рис. 3.13. Морфогенез в условиях *in vitro*:
a — корневой; *б* — стеблевой

субкультивирования (отбора инокулята и пересадки на свежую питательную среду). В большинстве случаев суспензию для субкультивирования отбирают в конце экспоненциальной фазы (через 14–16 дней после начала культивирования). При построении кривой роста показатели снимают через день. Плотность суспензии за две-три недели культивирования возрастает в среднем в 20 раз. Клетки суспензий удобнее всего подсчитывать в специальных счетных камерах Фукса — Розенталя или Горяева. Объем выборки должен составлять не менее 1000 клеток. Подсчет клеток затрудняется, если в суспензии преобладает фракция агрегатов. В таких случаях к одному объему культуры добавляют два объема 8%-го оксида хрома и нагревают до 70 °С в течение 2–15 мин. После охлаждения культуру встряхивают, чтобы распались агрегаты. Для разрушения агрегатов в суспензию добавляют пектиназу — 0,25 % объема.

Плотность суспензии можно определить и по соотношению объема биомассы к общему объему суспензии. Измеряют средний объем клетки и получают число клеток в 1 мл суспензии.

Цель работы: научиться определять плотность суспензионной культуры для изучения характера ее роста.

Оборудование и материалы: микроскоп, центрифуга, стерильная пипетка, предметное стекло, покровное стекло, камера для подсчета Фукса — Розенталя или Горяева, фильтровальная бумага.

Объект исследования: суспензионная культура.

Ход работы.

Колбу с суспензией встряхнуть и отобрать пипеткой несколько миллилитров. 1 мл суспензии смешать с 2 мл 8%-го оксида хрома и поставить на 15 мин в термостат при температуре 70 °С. Смесь пропустить три раза через шприц с толстой иглой (пипетировать). Камеру Фукса — Розенталя или Горяева заполнить суспензией. Для этого притереть покровное стекло до появления колец Ньютона. Подсчитать количество клеток под микроскопом. Подсчет клеток осуществляется в пяти больших квадратах (в четырех — по диагонали и в одном — в любом верхнем или нижнем углу сетки). Плотность суспензии, т. е. число клеток, рассчитать (в мл) по формуле

$$X = M \times N \times 1000 : 3,2,$$

где X — число клеток в мл; M — среднее число клеток в камере; N — разведение; $3,2$ — постоянная величина.

Задание. Показатели снимать через день в процессе всего культивирования. По ним построить кривую роста суспензии, используя суспензионную культуру из предыдущей работы.

Лабораторная работа № 13

Определение степени агрегированности и жизнеспособности суспензии

В зависимости от целей исследования, условия культивирования и состав питательной среды подбирают так, чтобы в суспензии преобладала определенная фракция клеток. Обычно в суспензии различают четыре основные фракции: одиночные клетки, мелкие агрегаты, средние агрегаты, крупные агрегаты. Агрегаты не должны содержать более 10–12 клеток. Степень агрегированности определяют, подсчитывая клетки в нескольких полях зрения на временных препаратах под малым увеличением микроскопа (не менее 1000 клеток).

При работе с суспензией необходимо учитывать ее жизнеспособность. О жизнеспособности клеток можно судить по движению цитоплазмы, степени проницаемости клеточной стенки для красителей, активности ферментов.

Прижизненные красители (такие, как метиленовый синий) не убивают клетки и не проникают через мембраны живых клеток в цитоплазму. Суспензия считается жизнеспособной, если более 70 % клеток не окрашиваются в синий цвет; агрегат жизнеспособен, если более 50 % его клеток не окрасились.

Цель работы: определить степень агрегированности и жизнеспособности суспензионной культуры.

Оборудование и материалы: микроскоп, 0,1% -й раствор метиленового синего, дистиллированная вода, предметные и покровные стекла, пипетки, марлевые салфетки, фильтровальная бумага.

Ход работы.

Приготовить препарат суспензии: встряхнуть суспензию в колбе, пипеткой отобрать небольшое количество суспензии, поместить каплю суспензии на предметное стекло, добавить каплю красителя, накрыть покровным стеклом, излишки жидкости убрать фильтровальной бумагой. Поместить препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива и подсчитать клетки и агрегаты в трех полях зрения (просмотреть не менее трех препаратов).

Задание. Результаты записать в виде таблицы. Один препарат зарисовать, описать морфологию клеток суспензии (форму, величину, окраску). Сделать вывод о степени агрегированности (какие фракции преобладают, %) и жизнеспособности (количество неокрашенных клеток, %) суспензии.

Лабораторная работа № 14**Высев суспензионной культуры на твердую агаризованную среду**

Культивирование отдельных (одиночных) клеток позволяет получать микроколонии и исследовать генетическую и физиологическую стабильность или изменчивость этого материала. Одиночные клетки используют в клеточной селекции мутантных, гибридных и трансформированных линий. В эти клетки можно ввести новые гены, в то же время это хорошая модель для изучения ее онтогенеза и физиологии. Источником отдельных (одиночных) клеток являются клеточные суспензии, растущие на жидкой питательной среде. Для получения микроколоний каллусной ткани используется метод плейтинга — смешивание суспензии клеток с агаризованной питательной средой в равных пропорциях.

Цель работы: получить микроколонии каллусной ткани из суспензионных клеток.

Оборудование и материалы: стерильные чашки Петри; чашки Петри с агаризованной средой; стерильные препаровальные иглы, цилиндр, пинцеты; флаконы с 96%-м спиртом; спиртровка.

Объект исследования: суспензионная культура.

Ход работы.

Клеточную суспензию перелить в стерильный цилиндр и оставить на 5 мин. Пипеткой отобрать 5 мл верхней фракции суспензии (в верхнем слое суспензии преобладает фракция одиночных клеток) и смешать с 5 мл агаризованной (1,4 % агара) среды для культивирования каллуса. Работу проводить в стерильной посуде: мерном цилиндре, стакане. Полученную смесь разлить в стерильные чашки Петри слоем до 1 см. Чашки Петри закрыть крышками и герметизировать парафилмом. Рассчитать количество высеянных клеток. Количество колоний подсчитать через три — шесть недель.

Задание. Результаты зарисовать, подсчитать количество выросших колоний в каждой чашке Петри.

Определить эффективность посева:

$$\text{ЭВ} = \frac{\text{количество образовавшихся колоний}}{\text{количество высеянных клеток}} \times 100\%,$$

где ЭВ — эффективность посева.

Лабораторная работа № 15

Индукция органогенеза в каллусной ткани картофеля

Фитогормоны — это биологические регуляторы роста и развития растений, осуществляющие взаимодействие клеток, тканей и органов, стимулирующие и ингибирующие морфогенетические и физиологические процессы в растительных организмах. Фитогормоны влияют на деление и рост клеток растяжением, состояние покоя, созревание, старение, формирование пола, устойчивость к стрессу, тропизмы, транспирацию; обеспечивают функциональную целостность растительного организма, закономерную последовательность фаз индивидуального развития.

Ауксины в культуре тканей вызывают рост клеток растяжением и деление, в сочетании с цитокининами — органогенез. В биотехнологии применяют как природные ауксины (ИУК), так и синтетические — ИМК (индолил-3-масляная кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), НУК (нафтилуксусная кислота).

Цитокинины в сочетании с ауксинами индуцируют митозы, пролиферацию клеток, почек и побегов. К природным цитокининам относятся: зеатин, кинетин (6-фурфуриламинопурин); к синтетическим — БАП (6-бензиламинопурин).

Следовательно, изменяя соотношение гормонов в питательных средах, можно в какой-то степени изменять и генетические программы клеток и тканей. Эти процессы известны как дифференциация клеток и тканей, дедифференциация и редифференциация.

В 1955 г. Скуг и Миллер предложили гипотезу гормональной регуляции в культуре клеток и тканей, которая сейчас известна как правило Скуга — Миллера: если концентрации ауксинов и цитокининов в питательной среде относительно равны или концентрация ауксинов незначительно превосходит концентрацию цитокининов, то образуется каллус; если концентрация ауксинов значительно превосходит концентрацию цитокининов, то формируются корни; если концентрация ауксинов значительно меньше концентрации цитокининов, то образуются почки, побеги.

Таким образом, для индукции органогенеза каллусы пересаживают на среду с высоким содержанием цитокининов, а для укоренения образовавшихся побегов используют среду с повышенным содержанием ауксинов.

Индукция морфогенеза и регенерация растений — сложный многостадийный процесс. У каллусной культуры картофеля можно выделить несколько стадий: индукцию зеленых меристематических зон; появление почек *de novo*; формирование микропобегов с последующим их укоренением.

Цель работы: провести индукцию органогенеза в каллусной ткани картофеля.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс; колбы емкостью 50 мл со стерильной питательной средой (МС без гормонов); колбы со средами для органогенеза и ризогенеза; стерильные препаровальные иглы, пинцеты; флаконы с 96%-м спиртом; спиртровка.

Объект исследования: пробирки с каллусами картофеля.

Ход работы.

Стерильным пинцетом переложить каллусы на стерильную поверхность, разделить на кусочки 5 × 5 мм и помес-

тить в колбы с питательными средами: а) МС без гормонов; б) МС + 2 мг/л 6-БАП + 1 мг/л НУК. Колбы перенести в культуральную комнату с температурой 25 °С, влажностью воздуха 70 % и интенсивностью освещения 3 Клк.

Через одну неделю отметить появление структурированных очагов, через три — пять недель — меристематических зон ярко-зеленого цвета. Еще через одну-две недели отметить появление апексов.

При дальнейшем культивировании апексы превращаются в микропобеги.

На одном экспланте может дифференцироваться до нескольких десятков побегов. Когда они достигнут высоты 10 мм, отделить их от каллусной ткани в стерильных условиях. Перенести побеги на питательные среды для индукции корнеобразования: а) МС без гормонов; б) МС + 2 мг/л ИМК + 1 мг/л ГК. Поместить на 20 дней в темноту. Через 7–14 дней отметить появление корней.

Задание. Записать количество апексов, появившихся на каждом каллусе. Результаты эксперимента зарисовать через две, четыре, шесть и восемь недель. Сделать выводы о влиянии различных гормонов на органогенез каллусной ткани.

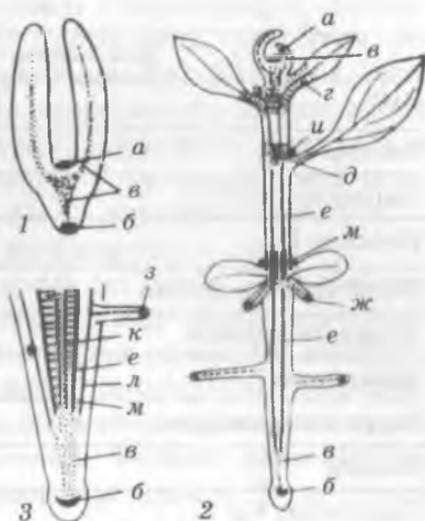
Лабораторная работа № 16

Изолирование и культивирование апикальных меристем картофеля

В культуре тканей можно размножить растения и получить оздоровленный (безвирусный) посадочный материал. Для оздоровления растений используют культуру апикальных меристем. Активно делящиеся клетки конуса нарастания, расположенного на верхушке побега, не содержат вирусов. Обычно на питательные среды высаживают небольшую часть меристемы — 0,5 мм. Чем меньше величина меристемы, тем больше вероятность получения безвирусных растений. Биотехнология позволяет получать безвирусный оздоровленный посадочный материал практически всех сельскохозяйственных культур.

Меристематические ткани:

1 — в зародыше семени; 2 — в проростке растения; 3 — в кончике корня; а — верхушечная меристема побега; б — верхушечная меристема корня; в — прокамбий; г — интеркалярная меристема листа; д — интеркалярная меристема побега; е — камбий; ж — верхушечная меристема придаточного корня; з — верхушечная меристема бокового корня; и — верхушечная меристема пазушной почки; к — ксилема; л — перидикл; м — флоэма



Наиболее полно разработана технология получения безвирусного картофеля. В культуре тканей используют апексы верхушечных и боковых почек. Клубни картофеля хранят при 4–6 °С, затем проращивают при 20–22 °С.

Цель работы: получить апикальные меристемы картофеля и пронаблюдать за развитием из них побега.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс; чашки Петри; пробирки со средой; флаконы со стерилизующими растворами (0,2% -й диацид или 70% -й спирт); стерильная дистиллированная вода; бинокулярный микроскоп; стерильные препаровальные иглы, пинцеты, скальпели; спиртовка.

Объект исследования: проростки картофеля.

Таблица 3

Модифицированная питательная среда Мурасиге — Скуга (МС) для культивирования апикальных меристем картофеля

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л

Компоненты питательной среды	
CaCl ₂	5 мл/л
Тиамин-HCl	1 мг/л
Пиридоксин-HCl	1 мг/л
Витамин B ₁₂	0,015 мг/л
Никотиновая кислота	2 мг/л
Фолиевая кислота	0,5 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
Гидролизат казеина	1 г/л
Аденин	40 мг/л
Пантотенат Ca	10 мг/л
Рибофлавин	0,5 мг/л
Биотин	1 мг/л
Активированный уголь	10 г/л
ГК	2 мг/л
Кинетин	0,5 мг/л
Сахароза	20 г/л
Глюкоза	20 г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5,7-5,8	

Ход работы.

Поверхность ламинара, штативы, пробирки, микроскоп обработать ультрафиолетом и 96%-м спиртом. Руки протереть спиртом. Препаровальные иглы, пинцеты, скальпели поместить в 96%-й спирт и перед каждой манипуляцией обжигать на пламени спиртовки.

Проростки (2 см) отделить от клубней и поместить в чашки Петри со стерилизующими растворами: в диацид на 3-5 мин, в спирт — на 1-2 мин. Проростки промыть три раза стерильной дистиллированной водой и перенести в стерильные чашки Петри. Тонкой препаровальной иглой у проростков удалить все листья, последовательно обнажая верхушечные и

боковые меристемы с примордиями. Меристему с одним-двумя примордиями отделить от проростков, при этом величина экспланта должна быть не более 100–250 мкм. Экспланты перенести в пробирку на поверхность питательной среды. Пробирки закрыть пробками, поместить в штатив и перенести в культуральную комнату. В культуральной комнате поддерживают температуру 25 °С, влажность воздуха — 70 %, освещенность — 5 Клк и фотопериод — 16 ч.

В среднем от посадки меристемы на среду до формирования проростков с пятью-шестью листочками проходит 30–45 дней, в некоторых случаях от двух до восьми месяцев. Среда по мере истощения обновляют, и проростки периодически пересаживают на новые среды в стерильных условиях.

Задание. Через две, три и четыре недели проводят наблюдение за развитием из меристемы побега. Результаты зарисовать и сделать выводы.

Лабораторная работа № 17

Клональное микроразмножение картофеля путем черенкования побегов

Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляют с помощью черенкования. Такое размножение основано на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем при удалении верхушки побега. Из пазушных почек на питательных средах образуются побеги.

Растения, сформировавшие пять-шесть листочков, в стерильных условиях извлекают из пробирок и делят на сегменты (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Черенки высаживают на глубину междуузлия в питательные среды либо без гормонов, либо с добавлением ауксинов. Черенки культивируют в тех же условиях, что и меристемы. Рост стебля и корней начинается на третий-четвертый день после посадки на питательную среду, а полностью растения формируются через 12–15 дней. Каждое последующее черенкование проводят через 24–28 дней. Из одного растения можно получить пять — восемь черенков, а через два-три месяца — 3–5 тыс. черенков.

Если почки или черенки высадить на питательные среды с высоким содержанием цитокининов, то образуется

конгломерат почек и побегов. Полученные побеги легко отделяются друг от друга, их можно либо укоренить, либо использовать для дальнейшего микрочеренкования.

Цель работы: провести микроразмножение картофеля путем черенкования побегов.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс; пробирки с проростками; пробирки с питательной средой МС; стерильные препаровальные иглы, скальпели; флакон с 96% -м спиртом; спиртовка.

Объект исследования: стерильные проростки картофеля в пробирках.

Таблица 4

Модифицированная питательная среда Мурасиге — Скуга (МС) для микроразмножения картофеля черенкованием побегов

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макролей	50 мл/л
Маточный раствор микролей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	5 мл/л
Тиамин-СН1	1 мг/л
Пиридоксин-НС1	1 мг/л
Никотиновая кислота	2 мг/л
Аденин	40 мг/л
Кинетин	0,5 мг/л
Гибберелловая кислота	2 мг/л
Пантотенат Са	10 мг/л
Активированный уголь	10 мг/л
Сахароза	30 г/л
Агар-агар	7 г/л
рН 5,8	

Ход работы.

Подготовить ламинар-бокс и инструменты к работе. В ламинаре извлечь стерильные проростки картофеля из

пробирок. Побеги разрезать на сегменты (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Часть стебля над листом должна быть в два-три раза меньше, чем часть ниже листа. Микрочеренки помещают в питательную среду на глубину междоузлия. Пробирку закрыть пробкой, поместить в штатив и перенести в культуральную комнату. Необходимо соблюдать стерильность.

Задание. Пробирку с черенком зарисовать. Через одну, две и три недели провести наблюдение за развитием побега и зарисовывать этапы развития растения из черенка.

Лабораторная работа № 18

Получение микроклубней картофеля *in vitro*

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

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

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

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

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

Цель работы: изучить процесс клубнеобразования у проростков картофеля.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс, стерильные чашки Петри, пробирки с питательной средой для получения микроклубней, препаровальные иглы, пинцеты, скальпели, флаконы с 96%-м спиртом для стерилизации инструментов, спиртровка, вата.

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

Таблица 5

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

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	5 мл/л
Тиамин-HCl	1 мг/л
Пиридоксин-HCl	0,5 мг/л
Никотиновая кислота	0,5 мг/л
Аскорбиновая кислота	1 мг/л
Кинетин	0,5 мг/л
Сахароза	50 г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5,8–6,0	

Ход работы.

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

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

Лабораторная работа № 19

Получение безвирусного посадочного материала методом термотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем

В случае заражения посадочного материала вирусами применяют термотерапию (использование сухого горячего воздуха). В случаях заражения растений мозаичными, веретеновидными, нитевидными, палочковидными вирусами термическая обработка малоэффективна. В связи с этим дополнительно используют метод апикальных меристем. Для этого после термообработки апикальную меристему растений картофеля срезают и помещают в пробирки на питательные среды. Термообработку обычно проводят осенью и зимой. Весной из растений вычлениют пазушные почки — от 0,3 до 1 мм и высаживают на питательные среды (МС без гормонов, рН 5,7).

Цель работы: изучить влияние высокой температуры на развитие апикальных меристем картофеля.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс; кюветы с песком; пробирки с питательными средами; флаконы с водой; бинокулярный микроскоп; стерильные препаровальные иглы, скальпели; флаконы с хлорамином; флаконы с 96%-м спиртом; спиртровка.

Объект исследования: клубни картофеля.

Ход работы.

Здоровые клубни картофеля тщательно промыть проточной водой. Клубни обработать дезинфицирующим раствором (спирт, хлорамин), промыть стерильной дистиллированной водой. Вырезать глазки с частью паренхимы (1,5 × 1,5 см) и поместить в кюветы для проращивания и термотерапии.

Глазки разместить в кюветах со стерильным песком и проращивать одну-две недели при температуре 28–30 °С,

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

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

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

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

Лабораторная работа № 20

Выделение изолированных протопластов

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

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

Цель работы: получить изолированные протопласты механическим методом.

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

Объект исследования: кусочки растительных тканей (окрашенная эпидерма чешуи лука, листьев бегонии или традесканции).

Ход работы.

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

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

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

Лабораторная работа № 21

Изучение защитного действия криопротекторов на устойчивость растительных клеток к действию низких температур

При воздействии отрицательных температур в межклетниках растительных тканей образуются кристаллы льда, что приводит к повреждению клеточных мембран и обезвоживанию цитоплазмы. При определенной степени обезвоживания, индивидуальной для каждой растительной клетки, цитоплазма коагулирует.

Кристаллы льда могут образовываться и непосредственно в клетках. Они оказывают механическое действие на мембраны цитоплазмы, нарушают проницаемость плазмалеммы, а при длительной экспозиции на морозе вызывают гибель клеток. Скорость отмирания зависит от температуры, времени экспозиции, от водоудерживающей способности самой клетки. Увеличение количества криопротекторов в зимующих органах растений повышает водоудерживающую способность тканей и тем самым приводит к повышению их морозоустойчивости.

Цель работы: изучить влияние различных криопротекторов на устойчивость клеток к низким температурам.

Оборудование и материалы: 1 М раствор сахарозы; 1 М раствор глицерина; 8% -й раствор NaCl; дистиллированная вода; пробирки, штативы для пробирок; микроскопы; термометры; стерильные препаровальные иглы, скальпели; пипетки; стеклянные палочки; предметные и покровные стекла; пробочные сверла; карандаши по стеклу; лед или снег; фильтровальная бумага.

Охладительную смесь готовят, смешивая три части снега или льда с одной частью поваренной соли. Температура охлаждающей смеси — около -20°C .

Объект исследования: корнеплоды свеклы.

Ход работы.

Из корнеплода свеклы вырезают несколько пластинок толщиной 5 мм. С помощью пробочного сверла диаметром 5–6 мм делают высечки из этих пластинок. Высечки тщательно ополаскивают водой до полного удаления остатков клеточного сока. Затем по три-четыре высечки помещают в пробирки.

Пробирки подписывают согласно схеме опыта.

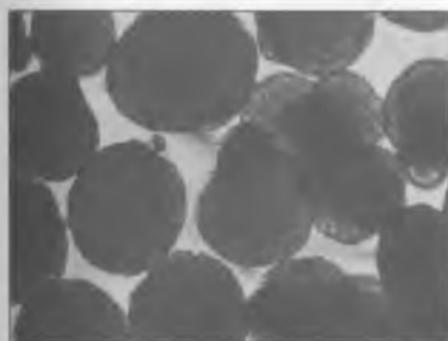
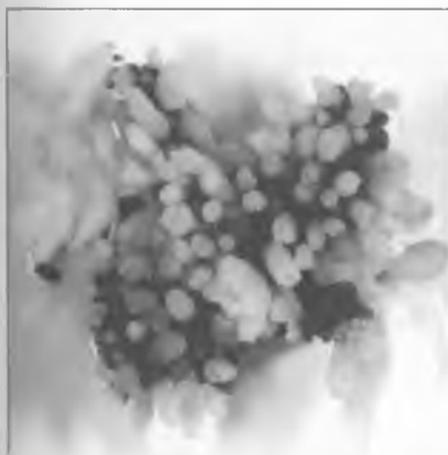
В пробирку № 1 наливают 5 мл дистиллированной воды (контроль);

в пробирку № 2 — 2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл воды;

в пробирку № 3 — 5 мл 1 М раствора сахарозы;

в пробирку № 4 — 2,5 мл 1 М раствора глицерина и 2,5 мл воды;

Рис. 3.14. Соматический эмбриогенез у культур *in vitro*



a



б



в



г

Рис. 3.15. Стадии соматического эмбриогенеза:
a — глобулярная; *б* — сердечко;
в — торпедовидная; *г* — соматический зародыш



a



б



в

Рис. 3.18. Размножение растений *in vitro* методом активации развития существующих меристем:
a — фуксии; *б* — роза; *в* — картофель



a



б



в

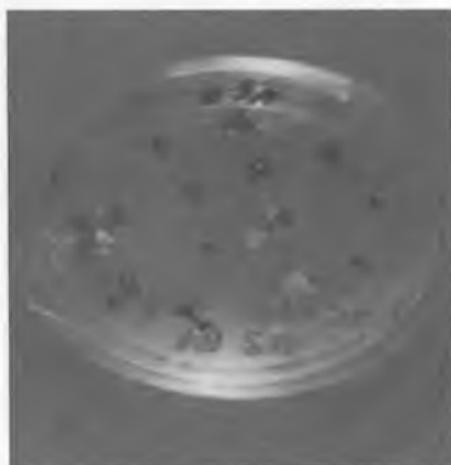


г

Рис. 3.19. Размножение растений *in vitro* методом индукции образования адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте:
a — сенполии; *б* — гиацинты; *в* — фритилярии; *г* — лилии



Земляника после длительного
криохранения меристем



Растения розы получены после
криохранения меристем

Рис. 5.1. Криосохранение (-196°C) и полное восстановление роста ценных сортов декоративных и сельскохозяйственных растений (по данным А.С. Попова, 2004)

в пробирку № 5 — 5 мл 1 М раствора глицерина;
в пробирку № 6 — 2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл
1 М раствора глицерина.

Пробирки с растительным материалом на 15–20 мин помещают в свежеприготовленную охлаждающую смесь. Затем их вынимают и размораживают в стакане воды комнатной температуры. После оттаивания визуально сравнивают интенсивность окраски высечек, цвет жидкостей в пробирках, отмечают различия и объясняют их.

Для проверки жизнеспособности клеток из анализируемых высечек готовят тонкие срезы и рассматривают их под микроскопом при малом увеличении в капле того же раствора, в котором они находились. Подсчитывают в одном поле зрения общее число клеток и число обесцвеченных клеток, из которых вышел бетацанин.

Для проверки жизнеспособности клеток также можно провести плазмолиз. Для этого тонкие срезы клеток из анализируемых высечек помещают на 10 мин в 8%-й раствор NaCl. Затем препараты просматривают под микроскопом и подсчитывают процент плазмолизированных клеток в поле зрения (не менее пяти полей зрения).

Задание. Результаты опыта занести в таблицу и сделать выводы о защитном действии криопротекторов на цитоплазму растительных клеток.

Лабораторная работа № 22

Влияние криопротекторов на белки цитоплазмы растительных клеток, подвергнутых воздействию отрицательных температур

При воздействии на растение экстремальных температур может происходить коагуляция белка. Выпадение хлопьевидного осадка белка из вытяжки растительной ткани — показатель ее повреждения. Криопротекторы стабилизируют нативную структуру белка, тем самым защищая ее от губительного воздействия низких температур.

Цель работы: изучить влияние криопротекторов на степень денатурации белков цитоплазмы растительных клеток.

Оборудование и материалы: 1 М раствор сахарозы, 1 М раствор глицерина, дистиллированная вода, пробирки, штативы для пробирок, микроскопы, термометры, препаровальные иглы, скальпели, пипетки, стеклянные палочки, предметные и покровные стекла, пробочные сверла, карандаши по стеклу, лед или снег, фильтровальная бумага.

Объект исследования: клубни картофеля, листья капусты.

Ход работы.

Картофель очищают и натирают на терке. Растертую массу переносят на двойной слой марли и отжимают через нее сок в стакан. Дают отстояться крахмалу, а надосадочную жидкость сливают и используют для опыта. Листья капусты мелко шинкуют, отжимают из них сок, который фильтруют через марлю.

Пробирки подписывают согласно схеме опыта.

В пробирку № 1 наливают 2,5 мл клеточного сока картофеля и 2,5 мл дистиллированной воды (контроль);

в пробирку № 2 — 2,5 мл клеточного сока и 2,5 мл 1 М раствора сахарозы;

в пробирку № 3 — 2,5 мл клеточного сока и 2,5 мл 0,5 М раствора сахарозы;

в пробирку № 4 — 2,5 мл клеточного сока и 2,5 мл 1 М раствора глицерина;

в пробирку № 5 — 2,5 мл клеточного сока и 2,5 мл 0,5 М раствора глицерина.

Аналогичным образом проводят разведение клеточного сока капусты.

Перемешивают содержимое в пробирках и ставят их на 15–20 мин в охлаждающую смесь. Охлаждающую смесь готовят, как в предыдущей работе (три части снега или льда и одна часть поваренной соли). Температура охлаждающей смеси — около -20°C . Затем пробирки вынимают из охлаждающей смеси и, не встряхивая, размораживают в стакане воды комнатной температуры. Наблюдают образование хлопьев коагулировавшего белка.

Задание. Результаты опытов занести в таблицу и зарисовать пробирки. Сделать выводы о защитном действии криопротекторов на белки и о морозоустойчивости различных растительных клеток.

*Лабораторная работа № 23***Обнаружение амилазы в прорастающих семенах**

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

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

Цель работы: изучить изменение активности амилаз в ходе прорастания семян.

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

Объект исследования: проросшие и непроросшие семена пшеницы.

Ход работы.

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

Разрезать несколько непроросших зерен пшеницы пополам, слегка смочить водой и разложить пинцетом на одной половине чашки Петри с крахмальным агаром поверхностью среза вниз, не вдавливая семена в агар. На другую половинку чашки Петри поместить несколько проросших семян того же растения, также разрезанных пополам и смочен-

ных водой (желательно оставить на некоторых проросших семенах корешки), и приложить их к поверхности крахмального агара. Закрывать чашки Петри, чтобы не было подсыхания семян. Через час осторожно снять семена и облить всю поверхность крахмального агара слабым раствором Люголя. Отметить, что в тех местах, где были размещены проросшие семена, агар не прокрасился, т. е. остался бесцветным.

Задание. Результаты опыта зарисовать. Сделать вывод об изменении активности амилаз при прорастании различных семян.

Лабораторная работа № 24

Кислотный гидролиз крахмала

Крахмал представляет собой полисахарид. Его молекула состоит из большого количества остатков глюкоз, соединенных попарно в мальтозы. Крахмал нерастворим в холодной воде, а в горячей образует коллоидный раствор — крахмальный клейстер. При кипячении крахмального клейстера с минеральной кислотой крахмал гидролизуется до глюкозы через ряд промежуточных продуктов с постепенно уменьшающейся молекулярной массой, называемых декстринами. Проследить за процессом гидролиза крахмала можно с помощью реакции с раствором йода, который окрашивает крахмал в синий цвет, амилодекстран — в фиолетовый, эритродекстран — в оранжевый, а с мальтодекстрином и мальтозой окрашивания уже не дает (остается желтым).

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

Оборудование и материалы: крахмал, 20%-й HCl , раствор Люголя, Na_2CO_3 , Феллингова жидкость, электроплитка, колбы, мерный цилиндр, стакан химический, штатив с пробирками, пипетки.

Ход работы.

Приготовить 0,1%-й крахмальный клейстер. Для этого отвесить 100 мг крахмала, высыпать крахмал в стаканчик, добавить 10 мл воды и тщательно размешать стеклянной

палочкой. Налить в колбу 90 мл воды, нагреть до кипения, вылить в нее содержимое стаканчика, взболтать, дать раствору еще раз закипеть и снять с огня.

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

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

ИСТОРИЧЕСКИЕ ВЕХИ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ*

8000 лет до н. э.

Жители Средней Азии одомашнивают дикие растения и животных для производства продуктов питания.

5000 лет до н. э.

В Китае и Египте семена тех растений, которые дают более высокие урожаи, отбирают и высаживают на будущий год для сбора еще более высоких урожаев.

4000 лет до н. э.

Зарождение искусства виноделия и начало применения биотехнологии для закваски теста и брожения пива в Древнем Египте.

3000 лет до н. э.

Народы Южной Америки выбирают картофель в качестве основной сельскохозяйственной культуры.

2000 лет до н. э.

Самаритяне овладевают процессом брожения и используют его в сыро- и пивоварении.

1000 лет до н. э.

В Вавилоне проводят под контролем опыление пальм, выборочно опыляя женские деревья пыльцой некоторых мужских особей.

500 лет до н. э.

Открыт первый антибиотик — масса из заплесневевших соевых бобов для лечения нарывов (Древний Китай).

* По материалам сайта интернет-журнала «Коммерческая биотехнология» (www.cbio.ru).

420 лет до н. э.

Древнегреческий философ *Сократ* (470–399 до н. э.) размышляет на тему, почему дети не всегда походят на своих родителей.

400 лет до н. э.

Древнегреческий врач *Гиппократ* (460–377 до н. э.) пришел к выводу, что «вклад» мужчины в наследственность ребенка находится в семенной жидкости. По аналогии, он предположил, что имеется подобная жидкость и в женщинах, так как дети получают черты от каждого из родителей в приблизительно равной пропорции.

320 лет до н. э.

Древнегреческий философ *Аристотель* (384–322 до н. э.), полемизируя с Гиппократом, утверждал, что все наследственные признаки приобретаются только от отца. Мужское семя определяет форму младенца, в то время как мать просто обеспечивает материал, из которого сделан младенец.

300 лет до н. э.

Древние греки развивают методы прививки и культивирования растений.

100–300 гг. н. э.

Индийские философы первыми начали полемику о характере природы воспроизводства и наследственности. Они утверждали, что дети наследуют характеристики обоих родителей. Кроме того, они полагали, что некоторые болезни могут передаваться по наследству.

Начало практики применения инсектицидов — использование пыльцы хризантем в Китае.

1100–1700 гг.

Преобладание концепции «самопроизвольного зарождения жизни» (spontaneous generation) — догмы, объясняющей, что организмы являются результатом процесса, не имеющего отношения к живому началу. Личинки, например, как предполагалось, появлялись из конского волоса.

1322 г.

Арабский вождь впервые использует искусственное осеменение для получения особенно выдающихся скакунов.

1500–1600 гг.

Процесс ферментации становится общеприменимым и позволяет получать как квашеные овощи, так и йогурт.

1630 г.

Английский врач *В. Гарвей* (Harvey, William, 1578–1657) высказал предположение, что млекопитающие, подобно курам, также развиваются из яйца. Однако понадобилось более двух сотен лет, прежде чем смогли обнаружить «яйцо» млекопитающего.

Голландский естествоиспытатель *Й.Б. ван Гельмонт* (van Helmont, Johann Baptista, 1579–1644) показал, что растения сами образуют органические вещества, а не получают их из почвы.

1665 г.

Изобретатель *Р. Гук* (Hooke, Robert, 1635–1703) с помощью сконструированного им микроскопа с увеличением в 30 раз обнаружил растительные «клетки на срезе пробки».

1668 г.

Итальянец *Ф. Реди* (Redi, Francesco, 1626–1697) использовал эксперимент для сравнения двух конкурирующих идей, объясняющий причину появления личинок на гниющем мясе. Он отметил, что на мясе, изолированном от воздуха, не наблюдалось появления личинок, в отличие от неизолированного. Это было расценено как первое опровержение теории «самопроизвольного зарождения жизни» и явилось первым фактом использования управляемого эксперимента.

1660–1675 гг.

Итальянскому биологу *М. Мальпиги* (Malpighi, Marcello, 1628–1694) с помощью микроскопа удалось обнаружить капилляры, детализировать анатомию тутового шелкопряда, описать развитие цыпленка в яйце и издать работу, посвященную анатомии растений.

1673 г.

Голландец *А. ван Левенгук* (van Leeuwenhoek, Anthony, 1632–1723), пользуясь линзами, дающими увеличение в 270 раз, сделал ряд открытий в микробиологии. Он был

первым ученым, который описал бактерии, открыл мир простейших, предполагая, что такие микроорганизмы могут являться причиной брожения, впервые увидел клетки животных — эритроциты.

1701 г.

Ныне забытый родоначальник садоводства *Т. Фейрчайлд* (Fairchild, Thomas) создает первое в Европе растение-гибрид.

1724 г.

Обнаружен факт перекрестного опыления у зерновых растений.

1748 г.

Английский натуралист *Дж.Т. Нидхем* (Needham, John Turbevill, 1713–1781) проводит опыты по термической обработке различных физиологических растворов, в которых присутствовали микроорганизмы. Исходя из этого, он пришел к заключению о «наличии вегетативной силы в каждом микроскопическом корпускуле», что говорило в поддержку теории «самопроизвольного зарождения жизни».

1761 г.

Немецкий ботаник *Дж. Кельрейтер* (Koelreuter, Joseph Gottlieb, 1733–1806) сообщает об успешном скрещивании некоторых видов хлебных злаков. Кельрейтер окончательно доказал наличие пола у растений, а своими работами по гибридизации показал участие в оплодотворении и развитии как яйцеклеток, так и пыльцы растений.

1798 г.

Английский врач *Э. Дженнер* (Jenner, Edward, 1749–1823) вводит ребенку вирусную вакцину с целью профилактики оспы, а также публикует книгу, в которой анализирует различия между вакцинацией и инокуляцией.

1799 г.

Итальянский естествоиспытатель *Л. Спалланцани* (Spallanzani, Lazaro, 1729–1799) описывает эксперименты, проведенные с использованием «герметично запечатанных» сосудов, нагреваемых в кипящей воде, с целью проверить возможность использования высокой температуры для уничтожения микробов в «экстракте» (физиологическом растворе).

1809 г.

Французский кондитер *Н. Анперт* (Appert, Nicolas, 1749–1841) изобрел способ остановки развития (размножения) микроорганизмов в пищевых и прочих продуктах — консервирование, за что получил вознаграждение от Наполеона в размере 12 тыс. франков.

1815 г.

Русский химик *К.Г.С. Кирхгоф* (1764–1833) получил из пшеницы экстракт, способный превращать крахмал в сахар.

1831 г.

Английский ботаник *Р. Браун* (Brown, Robert, 1773–1858) впервые описывает ядро растительной клетки — обязательный компонент почти всех клеток.

1838 г.

Немецкие ботаник *М. Шлейден* (Schleiden, Mathias, 1804–1881) и зоолог *Т. Шванн* (Schwann, Theodor, 1810–1882) первыми констатировали, что все организмы состоят из клеток и что растения и животные представляют собой скопления клеток, расположенных в определенном порядке. Их считают авторами «клеточной теории».

1839 г.

Чешский физиолог *Я. Пуркине* (Purkyne, Jan, 1787–1869) вводит для обозначения живого содержимого клетки термин «протоплазма».

1850 г.

Венгерский естествоиспытатель *И.Ф. Земмельвейс* (Semmelweis, Ignaz Philipp, 1818–1865) использовал эпидемиологические наблюдения, чтобы выдвинуть гипотезу, что лихорадка может передаваться при непосредственном контакте.

1852 г.

В Париже проходит международная выставка кукурузы («Corn Show»), где было представлено существующее многообразие сортов зерна из разных стран мира.

1856 г.

Французский ученый *Л. Пастер* (Pasteur, Louis, 1822–1895) утверждает, что за процесс брожения ответственны микробы.

1858 г.

Немецкий биолог *Рудольф Вирхов* (Virchow, Rudolf Ludwig Karl, 1821–1902) постулирует: «Каждая клетка по-является от клетки».

1859 г.

Английский естествоиспытатель *Ч. Дарвин* (Darwin, Charles, 1809–1882) публикует свой фундаментальный труд «Происхождение видов путем естественного отбора».

1861 г.

Л. Пастер открыл микроорганизмы, вызывающие маслянокислое брожение: анаэробные бактерии, живущие и развивающиеся без кислорода. Он предложил способ сохранения пищевых продуктов с помощью тепловой обработки (впоследствии названный пастеризацией).

1863 г.

Немецкий ботаник *Г. Бару* (de Bary, Heinrich Anton, 1831–1888) доказал, что причиной заболеваний картофеля является грибок.

1864 г.

Л. Пастер выдвинул теорию, что причиной гниения организмов является наличие маленьких организованных «корпускул», или микробов, в воздухе.

1865 г.

Австрийский монах *Г. Мендель* (Mendel, Gregor, 1822–1884) в результате изучения огородного гороха открывает законы наследственности. Он представил эти законы наследственности к рассмотрению Общества Естествознания в Австрии. Мендель предположил, что единицы наследственности, которые позже стали известны как гены, представлены у каждой живой особи парами; при образовании гамет (половых клеток) составляющие единицы каждой пары расходятся и переходят в разные гаметы. Работа Менделя осталась незамеченной и находилась в тени более сенсационной публикации Дарвина до 1900 г.

Английский хирург *Дж. Листер* (Lister, Joseph, 1827–1912) открыл возбудителя молочнокислотного брожения, а также начал использовать дезинфицирующие растворы для обработки ран в операционной хирургии, основываясь на теории Пастера.

1866 г.

Биолог-эволюционист Э. Геккель (Haeckel, Ernst, 1834–1919) сформулировал свой «биогенетический закон»; согласно этому закону, зародыши в процессе развития повторяют эволюционный путь, пройденный их предками.

Русский ботаник и почвовед М.С. Воронин (1838–1903) обнаружил в клубеньках на корнях бобовых растений мельчайшие тельца и впервые связал образование клубеньков с деятельностью бактерий.

1868 г.

Французский паразитолог К. Давэн (Davaïne, Casimir Joseph, 1812–1882) впервые использовал тепловую обработку для избавления растений от бактериальной инфекции.

Швейцарский врач Ф. Мишер (Miescher, Fredrich, 1844–1895), исследуя гной, выделил из ядер клеток гноя новый тип химических соединений, который он в совокупности назвал «нуклеином» (позднее эти соединения получили название нуклеиновых кислот).

1870 г.

Немецкий цитолог В. Флемминг (Flemming, Walter, 1843–1905) обнаружил эффект митоза — непрямого деления ядра клетки.

Начало работ по скрещиванию хлопка, что привело в ближайшие 20 лет к созданию сотни новых видов превосходящего качества.

1871 г.

Один из первых биохимиков Э. Хоуп-Сейлер (Hoppe-Seyler, Ernst, 1825–1895) обнаружил инвертазу — фермент, который расщепляет сахарозу на глюкозу и фруктозу.

Американский селекционер Л. Бербанк (Burbank, Luther, 1849–1926) вывел сорт красновато-коричневого картофеля и продолжил работы по гибридизации ряда плодовых и ягодных культур.

1875 г.

Ч. Дарвин выдвинул теорию существования «геммул» (гипотетическая наследственная частица) как части механизма наследования.

1878 г.

Дж. Листер описал технику изоляции чистых культур бактерий — важный шаг в понимании инфекционных заболеваний.

1879 г.

Немецкий физиолог *А. Коссель* (Kossel, Albrecht, 1853–1927) начал изучение нуклеина, что привело к открытию нуклеиновых кислот.

В штате Мичиган профессор ботаники *В. Бил* (Beal, William James, 1833–1924) провел первое контролируемое скрещивание кукурузы с целью увеличения урожайности и получил первый гибрид.

1880 г.

Изучая заболевания домашней птицы (холера), *Л. Пастер* публикует свою работу об ослабленных формах инфицирования организма, не приводящих к болезни, но защищающих против серьезных форм той же болезни в будущем.

Й. Дж. Ханстейн (von Hanstein, Johannes, 1822–1880) вводит термин «изолированные протопласты» — содержимое растительной клетки, окруженное плазмалеммой.

1881 г.

Немецкий микробиолог *Р. Кох* (Koch, Robert, 1843–1910) описал бактериальные колонии, вырастающие на тонких срезах картофеля, на среде желатина и на среде агара. Питательный агар становится обычным инструментом для получения чистых культур и для идентификации генетических мутантов. Это событие значительно повлияло на ускорение развития микробиологии.

Л. Пастер получил первые вакцины против бактериального патогенеза холеры домашней птицы, что явилось началом создания иммунологии и открыло новые области в профилактической медицине.

1882 г.

В. Флемминг обнаруживает и описывает «хроматин» (часть структуры клеточного ядра), который позже назвали хромосомами.

Р. Кох, экспериментируя на морских свинках, описал бактерию, которая является причиной туберкулеза у лю-

дей. Кох первым определил причину некоторых человеческих заболеваний. Он установил, что определенные болезни вызываются определенными микроорганизмами.

Русский биолог *И.И. Мечников* (1845–1916) наблюдал фагоцитное окружение микроорганизмов в личинках морской звезды. Позже он развил клеточную теорию для объяснения действия вакцин.

Швейцарский ботаник *А. Кандолл* (De Candolle, Alphonse-Louis-Pierre-Pyramus, 1806–1893) публикует первое исследование о происхождении и истории культивируемых растений. Его работа позже сыграет важную роль в работе *Н.И. Вавилова* о центрах происхождения культурных растений.

1883 г.

Немецкий физиолог *А. Вейсман* (Weismann, August Friedrich Leopold, 1834–1914) вводит термин «зародышевая плазма» («germ-plasm») и формулирует теорию «непрерывности зародышевой плазмы». В своей книге он утверждает, что мужская и женская родительские особи вносят равнозначный вклад в результаты наследственности, что воспроизводство, таким образом, получает новые комбинации факторов наследственности и что хромосомы должны быть причиной непосредственной передачи наследственности.

1884 г.

Р. Кох обнаружил свои «постулаты», утверждающие, что микроб является причинным агентом болезни.

Л. Пастер создал вакцину от бешенства.

Датский врач *Г. Грам* (Gram, Hans Christian Joachim, 1853–1938) описывает технику дифференцирования бактерий по морфологическим признакам, известную как метод окраски бактерий по Граму.

1887 г.

Бельгийский зоолог *Э. ван Бенеден* (van Beneden, Edouard-Joseph-Louis-Marie, 1846–1910) обнаружил, что каждый живой вид имеет определенное количество хромосом; он также открыл процесс формирования гаплоидных клеток.

Немецкий бактериолог *Р. Петри* (Petri, Richard Julius, 1852–1921) дал описание стеклянных сосудов, получивших

название «чашки Петри», для выращивания микробов на питательной среде (агар).

1892 г.

Русский ботаник *Д.И. Ивановский* (1864–1920) сообщил об открытии «вируса» мозаичной болезни растений табака. Он доказал, что эта «болезнь вызывается не каким-то возбудителем грибкового или бактериального происхождения, а еще меньшими и совсем простыми формами живых существ, которые могут проходить сквозь фильтр с наимельчайшими порами» и которые невозможно наблюдать при помощи существовавшей в то время техники.

Дж. Клеркер (Klerker, J.) впервые выделил протопласты во время механического повреждения ткани при изучении плазмолиза в растительных клетках.

1892–1902 гг.

Немецкие ученые *Г. Хаберландт* (Haberlandt, Gotlib, 1854–1945), *Х. Фёхтинг* (von Vöchting, Hermann, 1847–1917) и *К. Рехингер* (Rechinger, Karl, 1867–1952) попытались культивировать в растворе сахарозы растительные ткани, однако безрезультатно. Не достигнув экспериментальных успехов, эти исследователи высказали ряд важных идей и гипотез, подтвержденных значительно позже. Так, Хаберландт выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой растительной клетки.

1893 г.

Исследователи в Институте Листера (Lister Institute) выделили антитоксин дифтерии.

1895 г.

Русский микробиолог *С.Н. Виноградский* (1856–1953) продемонстрировал процесс фиксации азота бактериями *Clostridium* в анаэробных условиях.

1896 г.

Американский цитолог *Э. Вильсон* (Wilson, Edmund Beecher, 1856–1939) разработал в деталях хромосомную теорию наследственности Августа Вейсмана. Публикует книгу «Клетка в развитии и наследственности», в которой факты, добытые генетиками, цитологами, эмбриологами, эволюцио-

нистами, послужили основой для целостной теории хромосомной наследственности.

1897 г.

Немецкий химик Э. Бюхнер (Buchner, Eduard, 1860–1917) изготовил из дрожжей бесклеточный экстракт, превращающий сахар в спирт, и продемонстрировал таким образом факт существования ферментов. Это событие явилось ключевым моментом в процессе развития биохимии и энзимологии.

1899 г.

Исследование голландского ботаника и микробиолога М. Бейеринка (Beijerinck, Martinus Willem, 1851–1931) подтвердило работу Д.И. Ивановского по возбудителю мозаичной болезни табака; также ученый предположил, что вирус непосредственно включается в протоплазму клетки растения-хозяина.

1900 г.

Год рождения генетики как науки, когда три исследователя: Г. Де Фриз (de Vries, Hugo, 1848–1935) в Голландии, К. Корренс (Correns, Carl, 1864–1933) в Германии и Э. Чермак (von Tschermak, Erich, 1871–1962) в Австрии — независимо друг от друга — вторично «открыли» законы наследственности Г. Менделя.

Американский военный хирург В. Рид (Reed, Walter, 1851–1902) установил, что желтая лихорадка передается москитами; впервые было доказано, что человеческая болезнь может быть вызвана вирусом.

Вспышки болезней в переполненных индустриальных городах привели к внедрению крупномасштабных систем очистки сточных вод, основанных на деятельности микробов.

Начато производство основных промышленных химикатов (глицерин, ацетон и бутанол) с помощью бактерий.

1901 г.

М. Бейеринк выделил из почвы чистую культуру аэробных неспорообразующих бактерий, фиксирующих молекулярный азот. Новый вид азотфиксирующих клубеньковых микроорганизмов он назвал *Azotobacter chroococcum*.

И. Уайлдер (Wildier, E.) обнаружил «новое вещество, необходимое для развития дрожжей». Эти факторы роста теперь известны как витамины.

1902 г.

Американец *В. Самтон* (Sutton, Walter, 1877–1916) и немецкий цитолог и эмбриолог *Т. Бовери* (Boveri, Theodor, 1862–1915) — независимо друг от друга — предположили, что гены расположены в хромосомах и что каждая яйцеклетка или сперматозоид содержат только по одной хромосоме каждого типа. Эта идея положила начало хромосомной теории наследственности.

1903 г.

Сотрудник МСХ США *Г. Веббер* (Webber, Herbert John) предложил термин «клон» (греч. klón — черенок или побег, пригодный для размножения растений) для обозначения растений, полученных бесполом размножением; позже термин начал применяться и для обозначения «размножения» генов.

1904 г.

Английский биолог *В. Бейтсон* (Bateson, William, 1861–1926) продемонстрировал, что хромосомы наследуются как единое целое. Гены, локализованные в одной хромосоме, способны наследоваться совместно, поэтому они составляют одну группу сцепления; совместное наследование генов было названо «сцеплением генов». Это привело к необходимости «генетического картирования» для определения количества и последовательности расположения групп сцепления генов.

1905 г.

Э. Вильсон и *Н. Стивенс* (Stevens, Nettie Maria, 1861–1912) — независимо друг от друга — разработали теорию, устанавливающую, что X- и Y-хромосомы определяют пол. Они показали, что наличие одной Y-хромосомы определяет мужской пол, а двух X-хромосом — женский.

1906 г.

В. Бейтсон и один из первых английских генетиков *Р. Паннетт* (Punnett, Reginald Crudell, 1875–1967) в опы-

тах с душистым горошком обнаружили, что некоторые признаки не проявляют независимого наследования. Ввели термин «генетика».

1907 г.

Американский генетик *Т. Морган* (Morgan, Thomas Hunt, 1866–1945) положил начало изучению плодовой мушки (*Drosophila pseudoobscura*); доказал, что каждая хромосома имеет определенную функцию в процессе наследственности; разработал теорию мутации, что способствовало фундаментальному пониманию механизмов наследственности.

1908 г.

Селекционер кукурузы из Института Карнеги *Г.Х. Шулл* (Shull, George Harrison, 1874–1954) получил первую в США гибридную кукурузу методом самоопыления.

Английский врач *А. Гаррод* (Garrod, Archibald Edward, 1857–1937) впервые выдвинул предположение о непосредственной связи между генами и ферментами. Анализируя истории болезней близких родственников, он обнаружил наследственные биохимические аномалии, названные им врожденными ошибками метаболизма. Это явилось первым признанием важной роли генетики в биохимии, но само предположение осталось недооцененным до появления работы *Г. Бидла* (Beadle, George Wells, 1903–1989) и *Э. Тейтума* (Tatum, Edward Lawrie, 1909–1975) в 1941 г.

1909 г.

Датский биолог *В. Иоганнсен* (Johannsen, Wilhelm, 1857–1927) вводит термин «гены» и формулирует различия между понятиями «генотип» и «фенотип». Иоганнсен является одним из основоположников современной генетики; он создал учение о чистых линиях, заложил основы современных принципов селекции.

1910 г.

Т. Морган сформулировал современную концепцию о линейном расположении единиц наследственности — генов — в хромосомах.

1911 г.

В своих опытах с плодовой мушкой *T. Морган* обнаружил взаимосвязь между конкретными генами и конкретными хромосомами. Это явилось убедительным доказательством справедливости хромосомной теории наследственности.

1913 г.

Студент Т. Моргана *А. Стертевант* (Sturtevant, Alfred, 1891–1971) впервые установил порядок генов в хромосоме — построил первую карту гена.

1916 г.

Студент Т. Моргана *К. Бриджес* (Bridges, Calvin, 1889–1938) доказал взаимосвязь между конкретными генами и конкретными хромосомами, что подтвердило справедливость хромосомной теории наследственности.

1917 г.

Венгерский инженер *К. Эреки* (Ereky, Karl, 1865–1933) ввел термин «биотехнология». По его определению, биотехнология — это «все виды работ, при которых те или иные продукты производятся из сырьевых материалов с помощью живых организмов».

Немецкий генетик *Г. фон Плауг* (von Plough, H.H.) продемонстрировал обмен участками между гомологичными хромосомами, известный как «кроссинговер».

Французский ученый *Ф. Д'Эррелль* (D'Herelle, Felix Hubert, 1873–1949) обратил внимание на то, что какой-то невидимый агент разрушает культуры дифтерийных палочек, с которыми он работал. Так им были открыты вирусные паразиты бактерий, которым ученый дал название «бактериофаги».

1921 г.

Генетик *Г. Мюллер* (Muller, Herman, 1890–1967), студент Т. Моргана, отметил два важных общих свойства бактериофагов и генов: и те и другие способны к размножению, создавая точные копии самих себя; и те и другие в результате мутаций могут принимать новые формы.

1922 г.

Американский ученый *В. Роббинс* (Robbins, William Jacob, 1886–1937) и его немецкий коллега *В. Котте* (Kotte, Walter) показали возможность культивирования меристем (кончиков корней) томатов и кукурузы на твердых питательных средах.

Т. Морган изобрел методы картирования гена и создал карту хромосом плодовой мушки.

1925 г.

Н.И. Вавилов (1887–1943) начал первую из своих многочисленных экспедиций в десятки стран земного шара с целью изучения мировых растительных ресурсов. Н.И. Вавилов вооружил сельскохозяйственную науку методом поиска исходного материала для селекции растений.

1926 г.

Т. Морган опубликовал «Теорию генов» («The theory of the gene») — результат многочисленных экспериментов, позволивших раскрыть генетическую основу определения пола. Работа позволила объяснить ряд необычных форм наследования, при которых передача признака зависит от пола особи (так называемые признаки, сцепленные с полом).

1927 г.

Г. Мюллер, облучая живые организмы рентгеновскими лучами, обнаружил, что можно искусственно вызывать у них изменения генов. Применение рентгена ускоряет мутацию генов в 1500 раз, что позволило получать множество новых мутантных генов — дополнительный материал для изучения наследственности. Данные о природе мутаций стали основополагающими в понимании природы и строения самих генов.

1928 г.

Английский микробиолог *Ф. Гриффит* (Griffith, Frederick, 1877–1941) показал, что бактериальные клетки непатогенного штамма пневмококка могут трансформироваться в патогенные с помощью трансформирующего фактора.

Советский цитогенетик *Г.Д. Карпеченко* (1899–1942) скрестил редьку и капусту, впервые получив плодовой межродовой гибрид — фертильное потомство от разных видов.

1928–1935 гг.

Американский физик и химик *Л. Полинг* (Pauling, Linus Carl, 1901–1994) объяснил физические законы, влияющие на организацию атомов в молекулах. Он также описал серповидноклеточную анемию и определил, что эта мутация связана с определенными изменениями химической структуры молекул гемоглобина.

1929 г.

Химик-органик *Ф. Левин* (Levene, Phoebus, 1869–1940) обнаружил в молекулах нуклеиновых кислот, не содержащих рибозу, ранее неизвестный моносахарид — дезоксирибозу; теперь известно, что этот моносахарид входит в состав нуклеотидов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

Английский микробиолог *А. Флеминг* (Fleming, Alexander, 1881–1955) заметил, что все бактерии вокруг продуктов плесени *Penicillium notatum* на чашке Петри погибли. Началась эра пенициллина, хотя пройдет еще почти 12 лет, прежде чем этот антибиотик станет доступным для широкого использования.

1931 г.

Американский цитогенетик *Б. Мак-Клинтон* (McClintock, Barbara, 1902–1992) и *Х. Крейтон* (Creighton, Harriet) на основе полученных данных при исследовании кукурузы доказали, что в основе рекомбинации лежит кроссинговер, т. е. физический обмен участками хромосом между двумя разорванными хроматидами.

1934 г.

Английский физик *Д. Бернал* (Bernal, Desmond, 1901–1971) впервые показал, что такие гигантские молекулы, как белки, могут быть исследованы с помощью рентгеноструктурного анализа.

1935 г.

Американский вирусолог и биохимик *В. Стэнли* (Stanley, Wendell, 1904–1971) изолировал и кристаллизовал вирус табачной мозаики — первый случай очистки вируса. Он обнаружил, что в состав вирусов входят нуклеиновые кислоты и белки, т. е. те же соединения, из которых в основном состоят хромосомы высших организмов.

Советский биохимик, основоположник современной научной школы по нуклеиновым кислотам *А.Н. Белозерский* (1905–1972) первым выделил чистую ДНК.

1937 г.

Французский ученый *Р. Готпе* (Gautheret, Roger) с успехом культивировал недифференцированную ткань моркови. Он показал возможность долгого культивирования в условиях *in vitro* растительных тканей за счет периодического пересаживания их на свежую питательную среду. Это открытие дало новый толчок работам по изучению культуры ткани.

Английский вирусолог *Ф. Боуден* (Bawden, Frederick Charles, 1908–1972) обнаружил рибонуклеопротеидную природу вируса табачной мозаики (т. е. вирусы содержат рибонуклеиновую кислоту — РНК).

1938 г.

Английские исследователи *Г. Флори* (Florey, Howard, 1898–1968) и *Э. Чейн* (Chain, Ernst, 1906–1979) из Оксфордского университета приступили к исследованию противобактериальных веществ, образуемых некоторыми микроорганизмами, что позволило им в 1940 г. выделить из культуры плесневого гриба пенициллин.

Введен термин «молекулярная биология».

1939 г.

А.Н. Белозерский начал экспериментальную работу, доказывающую наличие ДНК и РНК в бактериях.

1940 г.

О. Эйвери, работая в Институте Рокфеллера (Rockefeller Institute, New York), изолировал чистую ДНК.

1941 г.

Американские генетики *Г. Бидл* и *Э. Тейтем*, экспериментируя с аскомицетом *Neurospora crassa*, разработали гипотезу «один ген — один фермент — одна реакция», т. е. каждый нормальный ген продуцирует определенный фермент, необходимый для организма. За это открытие в 1958 г. они были удостоены Нобелевской премии. Они также выдвинули гипотезу, что рентгеновское излучение вызывает повреждение генов.

Датский микробиолог А. Джост (Jost, Adolf) вводит понятие «генетическая инженерия».

Налажено крупномасштабное производство пенициллина.

1943 г.

Американские генетики С. Лурия (Luria, Salvador, 1912–1991) и М. Делбрук (Delbruck, Max, 1906–1981) провели эксперимент, получивший название «флуктуационный тест», доказывающий, что бактерии содержат спонтанно мутирующие гены, подобно всем другим организмам. Эта работа ознаменовала рождение бактериальной генетики как самостоятельной дисциплины.

1944 г.

О. Эйвери доказал, что носителем генетической информации является ДНК — наследственный материал, вызывающий трансформацию бактерий. Вначале эта теория не получила достойного внимания, так как на тот момент ученые полагали, что ДНК слишком простая молекула, чтобы содержать всю генетическую информацию, необходимую для организма.

Английский биохимик Ф. Сангер (Sanger, Frederick, 1918–1982) применил метод, названный хроматографией, для определения аминокислотной последовательности белка инсулина.

1946 г.

Американский генетик Дж. Ледерберг (Lederberg, Joshua, р. 1925) и Э. Тейтем продемонстрировали, что между членами генетически неоднородной популяции *E. coli* может происходить обмен генетической информацией и возникать новые генетические комбинации (генетическая рекомбинация). В то время генетическая рекомбинация у бактерий считалась невозможной.

Американские генетики М. Делбрук и А. Херши (Hershey, Alfred Day, 1908–1997) — независимо друг от друга — обнаружили, что генетический материал от различных вирусов может взаимодействовать, приводя к возникновению новой формы вируса. Этот процесс явился другим примером, подтверждающим возможность генетической рекомбинации.

Агроном-селекционер Сельскохозяйственной исследовательской службы США *С. Салмон* (Salmon, Cecil), будучи советником по сельскохозяйственным вопросам в посольстве США в послевоенной Японии, привозит домой семена сорта пшеницы Норин 10 (Norin 10) с геном карликовости. На основе этого японского сорта было создано много ценных короткостебельных или полукарликовых сортов озимой пшеницы, введение которых в культуру положило начало «зеленой революции».

1947 г.

Б. Мак-Клинтон сообщила об открытии у бактерий подвижных генетических элементов, известных сегодня как транспозоны. Научное сообщество не сумело оценить значение этого открытия в тот момент.

1949 г.

Установлено, что апикальная меристема практически не содержит вирусов. Это позволило создать технику культивирования и вегетативного размножения здоровых растений методом культуры ткани *in vitro*.

1950 г.

Американский биохимик *Э. Чаргафф* (Chargaff, Erwin, 1905–2002) в результате анализа ДНК пришел к выводу, что в ДНК общее количество аденина равно общему количеству тимина ($A = T$), а количество гуанина равно количеству цитозина ($G = C$). Эти данные составили важную часть фактического материала, на основе которого позднее была построена модель структуры ДНК Уотсона — Крика.

1952 г.

Дж. Ледерберг продемонстрировал перенос ДНК от одной бактерии к другой, опосредованный вирусом и названный трансдукцией. Ввел название «плазида».

А. Херши и *М. Чейз* (Chase, Martha Cowles, 1927–2003) провели эксперимент с целью выяснить, какие компоненты фага проникают в бактериальную клетку при ее заражении: ДНК, белок или оба эти вещества. Оказалось, что в клетку проникает только ДНК фаговой частицы, тогда как белковая оболочка остается снаружи. Этот результат подтвердил генетическую роль ДНК и опроверг роль белка.

Английский микробиолог *В. Хейс* (Hayes, William, 1918–1994) обнаружил эффект конъюгации — однонаправленный перенос ДНК из одной контактирующей бактериальной клетки в другую.

Бельгийский цитолог *Дж. Брэчет* (Brachet, Jean, 1909–1988) предположил, что РНК играет важную роль в синтезе белков.

Французский ботаник *Ж. Морель* (Morel, George Michel, 1916–1973) предположил, что, используя культивирование меристем, можно получать здоровые, избавленные от вирусной инфекции растения. Культивирование меристем побега — наиболее эффективный способ оздоровления растительного материала от вирусов, виридов и микоплазм.

1953 г.

Американские биохимик *Дж. Уотсон* (Watson, James Dewey, р. 1928) и генетик *Ф. Крик* (Crick, Francis, 1916–2004), работая в Кембридже (Molecular Biology Laboratory in Cambridge, England), описали структуру ДНК как двойную спираль (за что в 1962 г. получили Нобелевскую премию). Открытие структуры ДНК привело к активизации исследований в области молекулярной биологии и генетики, что положило начало биотехнологической революции.

В. Хейс обнаружил, что плазмиды можно использовать для переноса генетических маркеров из одной бактерии в другую.

1955 г.

Американские физиологи растений *Ф. Скуг* (Skoog, Folke Karl, 1908–2001) и *К. Миллер* (Miller, Carlos) открыли новый класс фитогормонов — цитокининов. Открытие дало возможность стимулировать деление клеток, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез в контролируемых условиях.

1956 г.

Американскому биохимику *Х. Френкель-Конрату* (Fraenkel-Conrat, Heinz, 1910–1999) удалось разделить вирус на его основные компоненты — белок и нуклеиновую кислоту — и затем вновь соединить их в активный вирус.

1957 г.

Американцы *Ф. Крик* и физик-теоретик *Дж. Гамов* (Gamow, George, 1904–1968) предложили концепцию «центральной догмы» молекулярной биологии: информация о структуре клеточных белков закодирована в нуклеотидной последовательности клеточной ДНК. Они также утверждали, что перенос генетической информации между биологическими макромолекулами происходит только в одном направлении: ДНК — мРНК — белок.

Американские молекулярные биологи *М. Мезельсон* (Meselson, Matthew Stanley, р. 1930) и *Ф. Сталь* (Stahl, Franklin William, р. 1929) продемонстрировали полуконсервативный механизм репликации ДНК. Он заключается в том, что обе цепи ДНК разделяются и на каждой синтезируется комплементарная ей цепь.

1958 г.

Американский биохимик *А. Корнберг* (Kornberg, Arthur, р. 1918) обнаружил и выделил ДНК-полимеразу — фермент, который использует одноцепочечную ДНК как матрицу и строит на ней вторую цепь ДНК.

Установлено, что серповидноклеточная анемия возникает в результате замены одной аминокислоты.

1959 г.

Французские микробиологи *Ф. Жакоб* (Jacob, Francois, р. 1920) и *Ж. Моно* (Monod, Jacques, 1910–1976) впервые установили факт существования механизма регуляции генов. Ими были определены участки регуляции транскрипции и сформулирована модель структурно-функциональной организации оперона и репрессора.

1960 г.

Английский ученый *Э. Коккинг* (Cocking, Edward C.) разработал ферментативный метод получения изолированных протопластов. Это послужило толчком к получению соматических гибридов, введению в протопласты вирусных РНК, клеточных органелл, клеток прокариот.

1961 г.

П.Д. Митчелл предложил хемиосмотическую теорию образования АТФ.

А. Мармур и П. Доти открыли явление ренатурации ДНК и установили точность и специфичность реакции гибридизации нуклеиновых кислот.

1962 г.

В. Арбером впервые получены сведения о ферментах рестрикции ДНК.

1963 г.

Американский биохимик *М. Ниренберг* (Nirenberg, Marshall, р. 1927) расшифровал генетический код, который оказался универсальным как для бактерий, так и для высших организмов вплоть до человека (за что получил Нобелевскую премию в 1968 г.). Тем самым генетическая информация и ее смысл, т. е. взаимосвязь между генетическим кодом и структурой белков, стали доступны для изучения.

Новые гибридные сорта пшеницы, выведенные агрономом и микробиологом *Н. Борлаугом* (Borlaug, Norman Ernest, р. 1914), позволили увеличить урожайность на 70 %. За работу по созданию короткостебельных сортов озимой пшеницы в 1970 г. Борлауг получил Нобелевскую премию и стал первым в истории селекционером растений — Нобелевским лауреатом.

1965 г.

Ученые заметили, что гены устойчивости к антибиотикам в бактериях локализованы на двухцепочечных кольцевых молекулах ДНК, называемых плазмидами. Это наблюдение привело к началу классификации плазмид.

1966 г.

М. Ниренберг и *Г. Маттэй* (Mathaei, Heinrich) продемонстрировали, что каждую из 20 аминокислот в молекуле мРНК (кодон) кодируют три смежных нуклеотида.

1970 г.

Э. Коккинг осуществил первое искусственное слияние протопластов с помощью индуктора слияния (фьюзогена), что открыло новый путь к созданию соматических гибридов.

Х. Темин, Д. Балтимор открыли процесс обратной транскрипции.

1971 г.

Американские ученые *С. Коэн* (Cohen, Stanley N., Stanford University, p. 1922) и *Г. Бойер* (Boyer, Herbert W., University of California, San Francisco, p. 1936) — независимо друг от друга — разработали стратегию переноса функциональной единицы наследственности (гена) из одного организма в другой.

1972 г.

Американский биохимик *П. Берг* (Berg, Paul, p. 1926) сконструировал и получил биологически активную гибридную плазмиду путем обработки рестриктазой двух плазмид с последующей их сшивкой ДНК-лигазой. Таким образом была создана первая рекомбинантная молекула ДНК.

С.И. Сингер и *Г.Л. Николсон* предложили жидкостно-мозаичную модель биомембраны.

1973 г.

С. Коэн и *Г. Бойер* обнародовали технологию использования рекомбинантной ДНК, что рассматривается как дата рождения современной биотехнологии. В 1974 г. Бойеру удалось запатентовать эту технологию, что позволило ему создать свою частную компанию.

1974 г.

Г. Мельхерс (Melchers, George) вводит термин «соматическая гибридизация», означающий процесс слияния протопластов соматических клеток.

В. Эрбер предложил использовать рестрикционные эндонуклеазы как инструмент анализа ДНК.

1975 г.

Ц. Мильштейн синтезировал первые моноклональные антитела.

1977 г.

В Гарвардском университете *В. Джилберт* (Gilbert, Walter, p. 1932) со своим аспирантом *А. Мэксамом* (Maxam, Allan M.) разработали быстрый метод химического анализа ДНК; появилась реальная возможность определять последовательность до 1000 нуклеотидов в неделю силами одного исследователя.

1978 г.

Ученые Стэнфордского университета (Stanford University) успешно пересадили ген млекопитающего в ДНК бактерии.

Впервые синтезирован рекомбинантный человеческий инсулин.

1979 г.

В Гарвардском университете *В. Бендер* (Bender, Welcome W.) и *Д. Хогнесс* (Hogness, David S., р. 1953) разработали метод клонирования ДНК, позволивший выделить и клонировать тысячи различных генов.

Компания «Дженентек» и Национальный медицинский центр г. Хоуп (The City of Hope National Medical Center) в Калифорнии объявили об успешном синтезе гена соматостатина и инсулина с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Так впервые была продемонстрирована экспрессия гена человека в бактериальных клетках.

Впервые синтезирован человеческий гормон роста.

1980 г.

Группа исследователей корпорации «Сетус» (Cetus Corporation, Беркли, Калифорния), возглавляемая *К. Мюллисом* (Mullis, Kary Banks, р. 1944), разработала способ получения *in vitro* большого количества специфических нуклеотидных последовательностей — полимеразную цепную реакцию, ПЦР (за что Мюллис получил Нобелевскую премию в 1993 г.). ПЦР будет названа наиболее революционным и эффективным инструментом молекулярной биологии 1980-х гг.

С. Коэну и *Г. Бойеру* выдан патент США (№ 4237224) на использование вирусных и плазмидных векторов для создания рекомбинантных ДНК.

1981 г.

В США проданы первые диагностические комплекты на основе моноклональных антител.

Впервые был маркирован автоматически синтезированный ген.

1982 г.

Начало эры трансгенных растений. Ученые создают первое культурное растение — продукт биотехнологий: стойкий к антибиотикам табак.

1983 г.

Международный Стэнфордский научно-исследовательский институт (Stanford Research Institute International) получил патент на экспрессирующий вектор для осуществления синтеза чужеродных белков в *E. coli*.

Американский биохимик *М. Каррутерс* (Caruthers, Marvin H., University of Colorado) предложил метод химического синтеза ДНК длиной до 75 пар нуклеотидов. Совместно с *Л. Худ* (Hood, Leroy E., California Institute of Technology, p. 1938) разработал первый прибор для автоматического синтеза — ДНК-синтезатор.

1984 г.

Бельгийские генетики *М. Ван Монтагю* (Van Montagu, Mark) и *Дж. Шелл* (Schell, Jeff) открыли механизм передачи генов от почвенных бактерий рода *Agrobacterium* в растения. Это позволило создать эффективные методы генетической трансформации для большинства видов двудольных растений.

1985 г.

Начало производства генно-инженерного микроорганизма, созданного для борьбы с заморозками.

Проведены первые полевые испытания трансгенных растений, устойчивых к насекомым, вирусам и бактериям.

1986 г.

Первый (неудачный) эксперимент Министерства сельского хозяйства США по созданию трансгенных животных в городе Белтсвилл (Beltsville, Md., штат Мэриленд). В эмбрион свиньи трансформирован человеческий ген гормона роста. Две особи погибают прежде, чем достигают половой зрелости, а третья парализована.

В США и во Франции проведены первые полевые испытания генетически модифицированного табака, толерантного к гербицидам.

Создана первая рекомбинантная вакцина для человека (вакцина против гепатита В).

Создан первый биотехнологический противоопухолевый препарат — интерферон.

1986–1995 гг.

За десятилетний период было проведено 3647 полевых испытаний 56 ГМ-растений в 18 странах мира. Из них 1952 испытания (54 %) осуществлено на территории США. Коммерческими стали только восемь основных культур, на которые приходится 28 % (1024) всех полевых испытаний: кукуруза — 33 %, масличный рапс — 21 %, картофель — 11 %, томат — 11 %, соя — 9 %, хлопчатник — 7 %, табак — 5 % и тыква — 3 %. Основными привнесенными характеристиками являются: гербицидная толерантность — 35 %, улучшенные качественные характеристики — 20 %, инсект-устойчивость — 18 %, вирусная резистентность — 11 %, устойчивость к грибковой инфекции — 3 % и другие (маркерные и селективные гены, устойчивость к бактериям и нематодам) — 13 %.

1987 г.

Американский генетик *М. Олсон* (Olson, Maynard Victor, Washington University) сконструировал новый тип экспрессирующего вектора — «искусственные дрожжевые хромосомы» (yeast artificial chromosomes), предназначенные для клонирования больших фрагментов ДНК.

1988 г.

Генетики *Ф. Ледер* (Leder, Philip) и *Т. Стюарт* (Stewart, Timothy) запатентовали первое животное, полученное с помощью методов генетической инженерии, — трансгенетическую мышь с повышенной частотой возникновения опухолей.

1989 г.

Создание в США Национального центра по исследованию человеческого генома (National Center for Human Genome Research), который возглавил *Дж. Уотсон*.

1990 г.

Молекулярный биолог *М. Фромм* (Fromm, Michael E.) из Центра экспрессии генов растений сообщил об устойчи-

вой трансформации кукурузы с помощью бомбардировки микрочастицами — метод баллистической трансфекции.

Официальное начало реализации международной программы «Геном человека» (Human Genome Project) в США. Конечная цель программы состоит в определении нуклеотидной последовательности всего генома человека к 2005 г., на что странами-участницами выделено 13 млрд долларов.

Компанией «Калджин» проведены успешные полевые испытания ГМ-растений, устойчивых к гербициду бромоксилилу.

1991 г.

Первая попытка экспериментальной генетической терапии успешно опробована на четырехлетней девочке, страдающей патологией иммунной системы.

Создана устойчивая к насекомым (Bt) кукуруза.

Одобен первый пищевой продукт, полученный с помощью генетически модифицированных дрожжей.

Проведены первые испытания генетически модифицированного позвоночного — форели — в природных условиях.

1994 г.

Первый биотехнологический пищевой продукт — томаты FLAVR SAVR — получил одобрение FDA.

Обнаружен первый ген, определяющий предрасположенность к раку груди.

Получено одобрение рекомбинантной версии человеческой ДНКазы, растворяющей скопления белка в легких больных мусковисцидозом.

Начато применение коровьего соматотропина.

1995 г.

В США разрешены к коммерческому использованию генетически модифицированные сорта сои Roundup Ready («Монсанто») и кукурузы Maximizer («Сибя-Гейги») и начинается в промышленных масштабах использование ГМ-сортов хлопчатника — Bollgard («Монсанто») и BXN Cotton («Калджин»).

Произведена первая трансплантация костного мозга от обезьяны человеку, больному СПИДом.

Й.К. Венгер с сотрудниками завершили секвенирование генома бактерий *Neisseria meningitidis* и *Mycoplasma genitalium*.

Генетическая терапия, модулирование иммунной системы и рекомбинантные антитела вводятся в клиническую практику для борьбы с онкологическими заболеваниями.

1996 г.

Группа ученых сообщает об определении полной нуклеотидной последовательности всего набора хромосом эукариотического микроорганизма — пивных (пекарских) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Это повысило ценность данного микроорганизма для научных исследований и доказало возможность картирования больших геномов, более 12 млн п. н.

Открытие гена, ассоциированного с развитием болезни Паркинсона, дало новые возможности изучения причин и разработки потенциальной терапии этого нейродегенеративного заболевания.

Первый год культивирования ГМ-культур, которые выращиваются в 6 странах на общей площади 1,7 млн га.

1997 г.

Исследователи из Института Рослина (Шотландия, Scotland's Roslin Institute) сообщили о клонировании первого млекопитающего — овцы Долли.

Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры выращиваются в семи странах на общей площади 11,0 млн га: соя — 5,1 млн га (46 %), кукуруза — 3,2 млн га (30 %), хлопчатник — 1,4 млн га (13 %) — это 7-кратный прирост, по сравнению с предыдущим годом.

1998 г.

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.

Завершена работа над секвенированием генома первого животного — круглого червя *Caenorhabditis elegans*.

Составлена приблизительная карта генома человека, на ней указано расположение более чем 30 тыс. генов.

Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры выращиваются в восьми странах на общей площади 27,8 млн га: соя — 14,5 млн га (52 %), кукуруза — 8,3 млн га (30 %), хлопчатник — 2,5 млн га (9 %) — 16-кратный прирост, по сравнению с 1996 г.

1999 г.

Создано путем трансформации первое растение с измененной пищевой ценностью — «золотой рис», содержащий бета-каротин, предшественник витамина А.

Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры выращиваются в 12 странах на общей площади 39,9 млн га: соя — 21,6 млн га (54 %), кукуруза — 11,1 млн га (28 %), хлопчатник — 3,7 млн га (9 %) — прирост составил 11 %, по сравнению с предыдущим годом.

2000 г.

Расшифрован первый полный геном растения *Arabidopsis thaliana* — растения, являющегося популярным модельным объектом в молекулярной биологии. Участвовали 27 лабораторий в США, Европе и Японии. Полученные данные позволяют понять, какие гены отвечают за специфические свойства у многих сельскохозяйственных культур, поскольку между всеми растениями много общего.

Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры выращивают более 3,5 млн фермеров в 13 странах на общей площади 44,2 млн га: соя — 25,8 млн га (58 %), кукуруза — 10,3 млн га (23 %), хлопчатник — 5,3 млн га (12 %) — это 26-кратный прирост, по сравнению с 1996 г.

2001 г.

Китайские исследователи объявляют о создании нового сорта риса, урожайность которого в два раза выше, по сравнению с обычными сортами.

Завершено секвенирование ДНК важных для сельского хозяйства микроорганизмов: азотфиксирующей бактерии *Sinorhizobium meliloti* и *Agrobacterium tumefaciens* — не-

опасного фитопатогена и настоящей находки для генных инженеров.

С целью создания культуры, способной расти на засоленных почвах, ген из *Arabidopsis thaliana* встроен в геном томатов.

Компания «Синджента» заявила об успешном окончании проекта картирования генома риса.

Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры выращивают около 5,5 млн фермеров в 13 странах на общей площади 52,6 млн га: соя — 33,3 млн га (63 %), кукуруза — 9,8 млн га (19 %), хлопчатник — 6,8 млн га (13 %) — это 31-кратный прирост, по сравнению с 1996 г.

2002 г.

Международные группы исследователей секвенируют геномы малярийного плазмодия и комара, переносящего этого паразита.

Опубликована черновая версия человеческого генома. Первый этап Human Genome Project завершен с опережением плана и экономией средств.

Большой прогресс достигнут в определении факторов, контролирующих дифференцировку стволовых клеток, идентифицировано более 200 генов, участвующих в этом процессе.

Объявлены положительные результаты применения вакцины от рака шейки матки, что демонстрирует возможность создания вакцин для профилактики злокачественных заболеваний.

Завершено секвенирование генома грибка, ежегодно уничтожающего огромное количество риса. Параллельное изучение геномов риса и его главного паразита позволит разобраться в молекулярных механизмах их взаимодействия.

Возникла необходимость пересмотра существующих взглядов на РНК, так как обнаружена чрезвычайная важность маленьких фрагментов РНК(si-RNA) в управлении многими функциями клетки.

Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры выращивают более 6 млн фермеров в 16 странах на общей площади 58,7 млн га: соя — 36,5 млн га (62 %), кукуруза — 12,4 млн га (21 %), хлопчатник — 6,8 млн га

(12 %) — это 35-кратный прирост, по сравнению с 1996 г.; 27 % от общей площади составляют угодья развивающихся стран.

2003 г.

Исследователи обнаружили ген предрасположенности к депрессии и приближаются к разгадке взаимосвязи между генетическими особенностями и шизофренией.

На рынке Северной Америки появляется GloFish — первое трансгенное декоративное животное, аквариумная рыбка, светящаяся красным в ультрафиолетовом свете, что достигается благодаря встроенному гену флуоресцирующего белка коралла.

Впервые клонирован представитель вымирающего вида бантенг (*Bos javanicus*). Также были впервые клонированы мулы, лошади и олени.

Овца Долли — «героиня» 1997 г. — подверглась эвтаназии из-за прогрессирующего заболевания легких.

Японские биотехнологи разработали первый не содержащий кофеина сорт кофе.

Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры выращивают около 7 млн фермеров в 18 странах на общей площади 67,7 млн га: соя — 41,4 млн га (61 %), кукуруза — 15,5 млн га (23 %), хлопчатник — 7,2 млн га (11 %) — это 40-кратный прирост, по сравнению с 1996 г. В 2003 г. в эту группу вступили Бразилия и Филиппины. Кроме того, Индонезия, Китай и Уганда одобряют импорт генетически модифицированных культур.

Великобритания одобряет внедрение первой биотехнологической культуры, устойчивой к гербицидам кормовой кукурузы.

Управление по охране окружающей среды США одобряет трансгенетическую кукурузу, устойчивую к насекомым-вредителям.

2004 г.

Корейские ученые создают первую линию человеческих эмбриональных стволовых клеток, полученную с помощью переноса ядра соматической клетки (терапевтическое клонирование).

FDA одобряет первый антиангиогенный препарат для лечения рака Авастин (Avastin (bevacizumab)).

FDA рекомендует первую минимизированную тест-систему для генотипирования «AmpliChip Cytochrome P450 Genotyping Test», ее использование предназначается для облегчения подбора лекарственных препаратов и установления точных диагнозов при большом количестве часто встречающихся патологических состояний.

Секвенирован геном лабораторной крысы.

Завершена работа по секвенированию генома шимпанзе — примата, являющегося ближайшим родственником человека.

Канадская биотехнологическая компания Iogen запустила первое промышленное производство биоэтанола из пшеничной соломы с помощью биотехнологических ферментов.

Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры выращивают около 8,25 млн фермеров в 17 странах на общей площади 81,0 млн га: соя — 48,4 млн га (60 %), кукуруза — 19,3 млн га (23 %), хлопчатник — 9,0 млн га (11 %) — это 47-кратный прирост, по сравнению с 1996 г.

2005 г.

Ученые университета штата Джорджия успешно клонировали корову из соматической клетки.

Утвержден Акт о политике в области энергетики, поощряющий производство биоэтанола.

На основе информации, полученной в результате секвенирования ДНК из сохранившихся образцов тканей, ученые Центров по контролю и профилактике заболеваний США восстановили геном штамма вируса гриппа, в 1918–1919 гг. уничтожившего около 20 млн человек.

Ученым Гарвардского университета — с помощью метода слияния (фузии) с эмбриональными стволовыми клетками — удалось трансформировать клетки кожи в плюрипотентные стволовые клетки.

ВОЗ обнародовала отчет «Современная пищевая биотехнология, здоровье и развитие человека». В отчете проанализированы результаты изучения влияния потребления ГМО на здоровье человека и еще раз сделаны выводы о безопасности разрешенных к коммерческому использованию трансгенных культур. Переход на биотехнологические

культуры может повысить количество собираемого урожая, качество пищи и разнообразие продуктов, которые можно выращивать в каждом конкретном регионе. Такие изменения будут способствовать улучшению состояния здоровья и питания населения, а также повышению стандартов здоровья и жизненного уровня; Министерство сельского хозяйства США совместно с компаниями Monsanto и Genaissance Pharmaceuticals объявили о начале работы над совместным проектом по секвенированию генома сои.

Суммарная (за 10 лет промышленного возделывания) площадь, на которой выращивались генетически модифицированные культуры, достигла круглой величины в 1 млрд акров (400 млн га).

Глобальная площадь, засеянная биотехнологическими культурами, составила 222 млн акров (89 млн га).

2006 г.

Американская ассоциация диетологов опубликовала повторно подтвержденное заявление в поддержку сельскохозяйственной и пищевой биотехнологии. Согласно заявлению, применение методов сельскохозяйственной биотехнологии может повысить качество, безопасность, питательную ценность и разнообразие пищевых продуктов с одновременным увеличением эффективности производства, обработки и распределения продуктов питания, а также мероприятий по охране окружающей среды и утилизации отходов.

Renessen LLC (совместное предприятие, организованное компаниями Monsanto и Cargill) получило одобрение Министерства сельского хозяйства США на продажу семян первой генетически модифицированной кормовой культуры. *Mavera High Value Corn with Lysine* — сорт кукурузы, отличающийся повышенным содержанием аминокислоты лизина, являющейся важным компонентом рациона животных, особенно свиней и домашней птицы.

Специалисты создали породу биотехнологических свиней, сало которых содержит большое количество омега-3 жирных кислот. Этот эффект достигнут путем встраивания в геном свиньи гена *fat-1*, выделенного из генома круглого червя *Caenorhabditis elegans*. Генетически модифицированных свиней клонировали, при этом в организме шести из

десяти клонов содержалось повышенное количество омега-3 жирных кислот, предотвращающих развитие сердечно-сосудистых заболеваний.

Всемирная торговая организация публикует окончательное конфиденциальное решение по делу США/Канада/Аргентина против Евросоюза по поводу одобрения биотехнологических культур. Из заявлений прессы следует, что, согласно решению, Евросоюз должен изменить свои коммерческие обязательства с учетом появления 21 сельскохозяйственного биотехнологического продукта, в том числе сортов масличного рапса, кукурузы и хлопка.

СЛОВАРЬ ОСНОВНЫХ ТЕРМИНОВ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ

АДВЕНТИВНЫЕ ПОЧКИ — почки на растениях, возникшие из клеток и тканей, обычно их не образующих.

АКРОПЕТАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ — транспорт веществ в растении по направлению к апикальным меристемам стебля.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ — ферменты, изменяющие свою активность в результате присоединения к их регуляторному (аллостерическому) центру вещества-эффектора.

АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ — ферменты, осуществляющие ковалентное присоединение аминокислот к 2'- или 3'-ОН концам тРНК.

АМПЛИФИКАЦИЯ — образование дополнительных копий хромосомных последовательностей ДНК.

АНЕУПЛОИД — ядро, клетка, организм с числом хромосом, отклоняющимся от X и от чисел, кратных X .

АНДРОГЕНЕЗ — процесс возникновения растения из микроспоры или пыльцевого зерна через соматический эмбриогенез либо через образование каллуса.

АНТИГЕНЫ — белки, индуцирующие образование в иммунной системе антител, способных к специфическому взаимодействию с веществом, вызывающим образование антител.

АНТИСТРЕССОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ — препараты, повышающие устойчивость растения в стрессовых условиях. Как правило, их действие связано с активацией синтеза организмом стрессовых белков.

АПЕКС — верхушечная часть стебля или корня.

АПИКАЛЬНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ — явление подавления роста верхушечных почек боковых побегов гормонами, вырабатываемыми в апикальной меристеме.

АР-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ — ферменты, разрезающие ДНК в апуриновых или апиридиновых участках.

АТТРАГИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ — способность активировать транспорт питательных веществ к органу с наибольшей концентрацией фитогормонов-стимуляторов (ауксины, гиббереллины, цитокинины, брассиностероиды).

АУКСИНЫ — фитогормоны (ИУК, НУК, 2,4-Д), активизирующие рост стеблей и корней, стимулирующие образование корней у проростков.

АУТОСОМЫ — набор хромосом, не включающий половые хромосомы (обозначаются цифрами: 1, 2, 3 и т. д.).

БАЗИПЕТАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ — транспорт веществ в растении по направлению к апикальным меристемам корня.

БАКТЕРИОФАГИ (ФАГИ) — вирусы, инфицирующие бактерии.

БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА (БТШ) — стрессовые белки, вырабатываемые организмом в ответ на сверхоптимальное повышение температуры.

БЕССМЫСЛЕННЫЙ КОДОН — один из трех триплетов (UAG, UAA, UGA), вызывающих терминацию синтеза белка (UAG известен как amber-кодон, UAA — как ochre-кодон, UGA — как opal-кодон). В настоящее время не рекомендуется употреблять термин «бессмысленный кодон», так как он выполняет конкретную функцию терминатора трансляции.

БИБЛИОТЕКА ГЕНОМА — набор клонированных фрагментов ДНК, содержащий весь геном.

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ — состояние защищенности человека, общества, цивилизации и окружающей среды от вредного, опасного для жизни и здоровья человека воздействия токсических и аллергенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЗА ПОСЕВАМИ — система мониторинга показателей биологических процессов у растений в онтогенезе, коррелирующих с ходом формирования урожая посевами в конкретных условиях выращивания.

БИОМАССА — общая масса особей одного вида, группы видов или сообщества в целом на единицу поверхности или объема местообитания.

БИОРЕМЕДИАЦИЯ — комплекс методов очистки вод, грунтов и атмосферы с использованием метаболического потенциала

биологических объектов: растений, грибов, насекомых, червей и других организмов.

БИОТЕХНОЛОГИЯ КЛАССИЧЕСКАЯ — наука о методах и технологиях производства, хранения и переработки сельскохозяйственной и другой продукции с использованием обычных, нетрансгенных, растений, животных и микроорганизмов в природных (естественных) и искусственных условиях.

БИОТЕХНОЛОГИЯ НОВЕЙШАЯ — наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных, микроорганизмов и вирусов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

БИОЦЕНОЗ — совокупность растений, животных и микроорганизмов, населяющих данный участок суши или водоема и характеризующихся определенными отношениями между собой и приспособленностью к условиям окружающей среды.

БИОЭТИКА — область междисциплинарных исследований этических, философских и антропологических проблем, возникающих в связи с прогрессом биомедицинской науки и внедрением новейших технологий в практику здравоохранения.

БЛОК ПРИБНОВА — каноническая последовательность ТАТААТG, находящаяся на расстоянии около 10 п. н. перед стартовой точкой транскрипции бактериальных генов. Представляет собой часть промотора, отвечающую за связывание РНК-полимеразы.

БЛОТТИНГ ДНК ПО САУЗЕРНУ — процедура переноса денатурированной ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр для гибридизации с комплементарными нуклеотидными последовательностями.

БЛОТТИНГ РНК — перенос РНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр для последующей гибридизации с комплементарной ДНК.

БРЕШЬ (ПРОБЕЛ) В ДНК — отсутствие одного или нескольких нуклеотидов в цепи ДНК.

ВЕДУЩАЯ ЦЕПЬ — цепь ДНК, синтезирующаяся в 5'-3'-направлении.

ВЕКТОР — самореплицирующаяся (автономная) молекула ДНК, используемая в генетической инженерии для переноса генов и других последовательностей от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.

ВТОРИЧНЫЙ ПОСРЕДНИК — физиологически активное регуляторное вещество, специфически стимулирующее активность протеинкиназ-ферментов, переносящих остаток фосфорной кислоты на другие белки, что приводит к изменению их конформации и биологической активности.

ГАПЛОИД — ядро, клетка, организм, характеризующиеся одинарным набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду (символ n).

ГЕН — единичная структура генетической информации, участок хромосомы (молекулы ДНК), кодирующий структуру одной или нескольких полипептидных цепей, или молекул РНК, или определенную регуляторную функцию.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ — совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с ними и введению их в другие организмы.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД (ГК) — система записи наследственной информации в виде последовательности нуклеотидов в молекулах нуклеиновых кислот. Единицей ГК служит кодон, или триплет (тринуклеотид). ГК определяет порядок включения аминокислот в синтезирующуюся полипептидную цепь.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ РИСК — возможность проявления непредсказуемых, опасных для здоровья и жизни человека и для окружающей среды наследственных изменений генома и качества организма.

ГЕНОМ — совокупность генов, содержащихся в гаплоидном (одинарном) наборе хромосом данного организма. Диплоидные организмы содержат два генома — отцовский и материнский.

ГЕННО-ИНЖЕНЕРНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ — деятельность ученых, специалистов, научных организаций и государственных органов, направленная на получение, испытание, транс-

портировку и использование генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов.

ГЕНОТЕРАПИЯ — лечение наследственных болезней с помощью введенных в геном реципиента чужеродных генов.

ГЕНОТИП — конкретный набор генов особи.

ГЕТЕРОЗИС — повышение жизнеспособности гибридов первого поколения в результате скрещивания исходных родительских форм, отличающихся между собой по ряду признаков и свойств.

ГИББЕРЕЛЛИНЫ — фитогормоны (ГК и др.), активизирующие рост стеблей, вызывающие прорастание семян.

ГИНОГЕНЕЗ — процесс возникновения растения из клеток зародышевого мешка.

ГОМОЗИГОТНОСТЬ — отсутствие различий между идентичными генами родителей.

ГОРМОНАЛЬНАЯ СИСТЕМА РАСТЕНИЙ — регуляторный комплекс, состоящий из фитогормонов, их рецепторов и вторичных посредников.

ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС — состояние гормональной системы в онтогенезе растений и животных, уровни гормонов и соотношения между ними в процессах образования, передвижения, использования и инактивации в ответ на эндогенные и экзогенные воздействия.

ГОРМОН-РЕЦЕПТОРНЫЙ КОМПЛЕКС — соединение гормона и белкового рецептора, первый необходимый шаг в реализации действия гормона.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ — регулирование государственными органами в соответствии с законами и другими правовыми актами отношений между участниками генно-инженерной деятельности в сфере природопользования, охраны окружающей среды и обеспечения экологической безопасности.

ДЕСТРУКЦИЯ — разрушение вещества, сопровождаемое потерей его физиологической активности.

ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ — переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации, т. е. к образованию недифференцированных неделящихся каллусных клеток (к неорганизованному каллусному росту — утрате специализации клетками).

ДЕТЕРМИНАЦИЯ РАЗВИТИЯ — приобретение клеткой, тканью, органом или организмом состояния готовности к развитию по определенному пути, сопровождающееся одновременным ограничением возможностей развития в других направлениях. В период детерминации создаются необходимые внутренние условия для последующей реализации нового направления развития.

ДИПЛОИД — ядро, клетка, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленных числом, характерным для данного вида (символ $2n$).

ДИПЛОИДИЗАЦИЯ — превращение гаплоидного набора хромосом в диплоидный путем удвоения каждой хромосомы.

ДИПЛОИДНЫЙ НАБОР ХРОМОСОМ — два гаплоидных набора хромосом, содержащие хромосомы только одного или обоих родителей.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ — комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА — состояние специализации клеток, отличающее их от других.

ДНК — молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты — системы, состоящей из нуклеотидов (аденин, гуанин, цитозин, тимин), дезоксирибозы и остатков фосфорной кислоты.

ДОМИНАНТ — ген, проявляющийся как признак при условии, когда гомологичные наборы имеют разные гены.

ЗИГОТА — оплодотворенная яйцеклетка.

ЗАТРАВКА — короткая последовательность (часто это РНК), комплементарно взаимодействующая с одной из цепей ДНК; образует свободный 3'-ОН-конец, используя который ДНК-полимераза начинает синтез дезоксирибонуклеотидной цепи.

ИЗОЛИРОВАННЫЙ ПРОТОПЛАСТ — растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного или механического разрушения.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ — фиксация низкомолекулярных лигандов, макромолекул, клеточных органелл и клеток на определенном носителе.

ИНВЕРТИРОВАННЫЕ ПОВТОРЫ — две копии одной и той же последовательности ДНК в составе одной молекулы, находящиеся в противоположной ориентации. Прилежащие друг к другу инвертированные повторы образуют палиндром.

ИНОКУЛУМ — часть клеточной суспензии, используемая для переноса на свежую питательную среду.

ИНТРОН — «молчащий», транскрибируемый участок гена, не содержащий кодонов и удаляющийся из молекулы РНК в ходе ее процессинга.

КАЛЛУС — группа дедифференцированных клеток, возникших *in vivo* или *in vitro* путем неорганизованной пролиферации.

КАЛЬМОДУЛИН — вторичный посредник гормонов растений и животных. После присоединения двух ионов кальция из него выделяется активная субъединица, активизирующая определенные протеинкиназы.

КАРИОТИП — набор хромосом, характерных для данного вида.

КЛЕТКИ-МИШЕНИ — клетки, имеющие рецепторы того или иного фитогормона и изменяющие метаболизм при изменении концентрации фитогормона.

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ — метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ — получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному растению.

КЛОНИРОВАНИЕ — получение генетически идентичных популяций организмов.

КОМПЕТЕНЦИЯ — способность клетки, ткани, органа, организма воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.

КЛОН — большое число клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле (культура, возникающая из одной клетки).

КОДОН — триплет нуклеотидов, соответствующий определенной аминокислоте или терминирующему сигналу.

КОМПЛЕМЕНТАРНАЯ ЦЕПЬ — одна из цепей ДНК, используемая в качестве матрицы для синтеза РНК и соответствующая ей по взаимодействию пар нуклеотидов.

КУЛЬТУРА ЗИГОТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ *IN VITRO* — асептическое выращивание на искусственной питательной среде незрелых или зрелых изолированных зародышей.

КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ПРОТОПЛАСТОВ — выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризованной среде, содержащей в качестве дополнительного компонента осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации. При регенерации стенок изолированные протопласты превращаются в культуру клеток.

КУЛЬТУРА КАЛЛУСОВ *IN VITRO* — выращивание в длительной пересадочной культуре каллусов, возникших путем дедифференциации и пролиферации клеток, тканей, органов растений.

КУЛЬТУРА КОРНЕЙ *IN VITRO* — асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней.

КУЛЬТУРА МЕРИСТЕМ *IN VITRO* — асептическое выращивание на искусственной питательной среде изолированного апекса или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями.

КУЛЬТУРА ОРГАНОВ *IN VITRO* — асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней, стеблевых апексов, незрелых частей цветка, незрелых плодов.

КУЛЬТУРА «ПРИВЫКШИХ» ТКАНЕЙ — выращивание тканей, возникших путем редифференциации или мутации клеток нормальных каллусных тканей и способных расти на питательных средах без гормонов.

КУЛЬТУРА СУСПЕНЗИОННАЯ, ИЛИ КУЛЬТУРА КЛЕТОК *IN VITRO* — асептическое выращивание отдельных клеток или их небольших групп во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде.

КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ *IN VITRO* — выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем проли-

ферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений.

ЛИГИРОВАНИЕ — образование фосфодиэфирной связи между двумя основаниями одной цепи ДНК, разделенными разрывом. Этот термин употребляют также в случае соединения тупых концов и при образовании связи в РНК.

ЛИНИЯ — культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

ЛИПКИЙ КОНЕЦ — свободный одноцепочечный конец двухцепочечной ДНК, комплементарной одноцепочечному концу, принадлежащему этой же или другой молекуле ДНК.

МАРКЕР (ДНК) — фрагмент ДНК известного размера, используемый для калибровки фрагментов в электрофоретическом геле.

МАРКЕРНЫЙ ГЕН — ген, идентифицированный по месту расположения и имеющий четкое фенотипическое проявление.

МАРКИРОВКА ПРОДУКТОВ ИЗ ГМО — нанесение специальных меток-обозначений (символов) на упаковке товаров и продуктов, полученных из ГМО, при их реализации.

МЕЙОЗ — процесс деления клеток, приводящий к редукции числа хромосом и рекомбинации генов.

МЕРИСТЕМА — образовательные ткани с активно делящимися клетками.

МЕТАБОЛИЗМ — промежуточный обмен, т. е. превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов.

МОНОПЛОИД — ядро, клетка, организм, характеризующиеся основным числом хромосом в полиплоидной серии (символ X).

МОРФОГЕНЕЗ — процесс формирования органов (органогенез), тканей (гистогенез) и клеток (цитогенез, или клеточная дифференцировка).

МУТАЦИЯ — спонтанное или индуцированное изменение гена, последовательности нуклеотидов хромосомы, генома, приводящее к изменению тех или иных признаков и сохранению их в поколениях.

МИТОЗ — процесс деления эукариотических соматических клеток.

МУТАГЕНЫ — факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций в молекуле ДНК.

НЕЗАМЕНИМЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ — аминокислоты, которые не синтезируются в организме человека и животных.

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ — наиболее высокомолекулярные природные соединения (полимеры), состоящие из остатков различных нуклеотидов. Существует два типа нуклеиновых кислот: РНК, ДНК.

ОМНИПОТЕНТНОСТЬ ЯДЕР — сохранение ядрами соматических клеток растений всех потенций ядра зиготы, т. е. сохранение всей генетической информации.

ОПЕРОН — единица генетической регуляторной структуры, в состав которой входят один или несколько связанных между собой структурных генов, а также промоторный, операторный и другие регуляторные участки, контролирующие транскрипцию оперона.

ОРГАНОГЕНЕЗ — процесс возникновения в неорганизованно растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней и побегов).

ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ СУПЕРСПИРАЛИЗАЦИЯ — введение в двухцепочечную ковалентно замкнутую ДНК супервитков, направление которых противоположно направлению витков цепей молекулы.

ПАРТЕНОГЕНЕЗ — развитие особи с участием только материнских генов.

ПЛАВЛЕНИЕ ДНК — денатурация ДНК.

ПЛАЗМИДА — основа плазмидного вектора: кольцевая двухцепочечная ДНК, обладающая способностью к автономной репликации, а также к встраиванию в нее и передаче в геном реципиента чужеродных генов и других последовательностей ДНК.

ПОЛИАДЕНИЛИРОВАНИЕ — присоединение последовательности полиаденилиновой кислоты к 3'-концу эукариотической РНК после завершения ее синтеза.

ПОЛИПЛОИД — ядро, клетка, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символы 3X, 4X и т. д.).

ПОЛОВЫЕ ХРОМОСОМЫ — хромосомы, определяющие пол особи (обозначаются буквами: X, Y, W, Z и т. д.).

ПРОДУКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС — сумма всех одновременно протекающих в растении физиологических, биохимических, биофизических и других процессов образования и метаболизма веществ, обеспечивающих формирование хозяйственно ценных органов растения и продуктов вторичного обмена на основе генетического контроля и донорно-акцепторных отношений.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ — новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

ПРОМОТОР — участок гена, ответственный за начало его транскрипции.

ПРОТОННАЯ ПОМПА — белки, переносящие протоны через клеточные мембраны.

ПРОТОПЛАСТ — содержимое растительной клетки, лишенной клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

ПРОФАГ — фаговый геном, интегрированный в бактериальную хромосому.

ПСЕВДОДИПЛОИД — ядро, клетки, организм, характеризующиеся диплоидным числом хромосом, отличающиеся от зигот данного вида по кариотипу.

РАЗРЫВ В ДУПЛЕКСЕ ДНК — отсутствие фосфодиэфирной связи между двумя соседними нуклеотидами в одной из цепей двухцепочечной ДНК.

РЕГЕНЕРАЦИЯ — восстановление целостного организма из клетки, ткани, органа.

РЕДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ — переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

РЕДУПЛИКАЦИЯ ДНК — самоудвоение молекулы ДНК путем образования ее копии с помощью набора ферментов (ДНК-полимераз, лигаз и др.).

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГЕН — ген, состоящий из компонентов различных генов.

РЕКОМБИНАЦИЯ — перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинативной изменчивости.

РЕЦЕССИВ — ген или генетически обусловленный признак, проявляющийся в диплоидной клетке или организме при условии, когда оба набора хромосом несут данные гены.

РИЗОГЕНЕЗ — процесс заложения, роста и развития корней.

РНК — молекула рибонуклеиновой кислоты, в состав которой входят нуклеотиды (аденин, гуанин, цитозин, урацил), рибоза и остатки фосфорной кислоты.

РОСТОВОЙ ЦИКЛ — рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризующийся сигмоидальной (S-образной) кривой.

СИНЕРГИЗМ — эффект взаимного усиления действия веществ, процессов и других факторов.

СЛИЯНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПРОТОПЛАСТОВ — формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

СОМАКЛОНЫ — регенеранты растений, полученные из соматических клеток и обладающие определенными отличиями от исходных форм.

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ — размах колебаний в различии признаков у растений, регенерированных из культивируемых соматических клеток.

СОМАКЛОНАЛЬНЫЕ ВАРИАЦИИ И ВАРИАНТЫ — фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органелльных цитоплазматических геномов культивируемых клеток. От истинных генных мутаций отличаются большей частотой возникновения и комплексностью изменений (изменения в структуре генов, хромосом, геномов).

СОМАТИЧЕСКАЯ (ПАРАСЕКСУАЛЬНАЯ) ГИБРИДИЗАЦИЯ — процесс вовлечения в генетическую рекомбинацию хромосом и генов ядра и органелл вне сексуального цикла, например путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений.

СОМАТИЧЕСКИЙ ГИБРИД — растение-регенерант, полученное путем слияния (гибридизации) соматических клеток.

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ — процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре ткани и клеток.

СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ — специальные белки, синтезируемые организмом в неблагоприятных условиях и позволяющие снизить вредоносное воздействие стрессовых факторов на организм.

СУБЪЕДИНИЦЫ — белковые глобулы, из которых состоят молекулы белков (четвертичная структура).

СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ — перенос трансплантов (инокулюма) в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

СУСПЕНЗИОННАЯ КУЛЬТУРА — суспензия клеток или их агрегатов (небольших групп) во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

СУБПРОТОПЛАСТ — изолированный протопласт, потерявший часть цитоплазмы, сохранивший ядро.

ТОТИПОТЕНТНОСТЬ — свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свою наследственную программу онтогенетического развития при определенных условиях выращивания, вплоть до образования взрослых растений и семян.

ТРАНСГЕНЕЗ — процесс переноса с помощью различных векторов донорских, чужеродных генов в клетки реципиентных растений, животных и микроорганизмов.

ТРАНСГЕННЫЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОРГАНИЗМЫ (ГМО) — растения, животные, микроорганизмы и вирусы с измененной наследственностью, вызванной включением в их геном чужеродных генов с помощью генно-инженерных методов.

ТРАНСЛЯЦИЯ — синтез белка на рибосомах при участии информационной, транспортной РНК и других факторов.

ТРАНСКРИПЦИЯ — образование РНК-копии ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы.

ТРАНСПЛАНТ (ИНОКУЛИУМ) — часть каллусной (суспензионной) культуры, используемой для пересадки на свежую питательную среду.

ФАЗЫ РОСТОВОГО ЦИКЛА: латентная (лаг-фаза), экспоненциальная (лог-фаза, фаза логарифмического роста), замедления роста, стационарная (плато), старения (деградации).

ФЕНОТИП — сумма внешних признаков организмов, определяемых генотипом и условиями выращивания.

ФЕРМЕНТИРОВАННЫЙ СОК — жидкий белковый раствор, образующийся в процессе ферментации растительного сока.

ФИТОАЛЕКСИНЫ — гипотетические и реальные компоненты системы устойчивости растений к болезням, замедляющие развитие патогена.

ФИТОГОРМОНЫ (гормоны растений) — биологически активные соединения, образующиеся в растениях в малых количествах, вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект.

ФИТОРЕГУЛЯТОРЫ — природные и синтетические препараты, вызывающие различные ростовые или формативные эффекты и не обладающие действием удобрений и гербицидов.

ХРОМОСОМЫ — генетические структурные образования ядра клетки, состоящие из ДНК и белков. В хромосомах заключена наследственная информация организма.

ЦИБРИД — растение, полученное при слиянии изолированного протопласта с цитопластом, протопластом с инактивированным ядром или с энуклеированным протопластом.

ЦИКЛ ВЫРАЩИВАНИЯ — период от помещения клеточного инокулюма или каллусного транспланта на питательную среду до следующего субкультивирования.

ЦИТОКИНИНЫ — фитогормоны (кинетин, 6-БАП), активизирующие развитие меристем, стимулирующие образование почек.

ЦИТОПЛАСТ — ограниченный мембраной участок цитоплазмы, возникший при фрагментации изолированного протопласта.

ШТАММ — культура, возникшая после первого субкультивирования и состоящая из многих клеточных линий, возникших из клеток первичного каллуса.

ЭКСПЛАНТ — фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА — проявление генетической информации, записанной в гене, в форме рибонуклеиновой кислоты, белка и фенотипического признака.

ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ — метод переноса генов в клетки с помощью электрического разряда, вызывающего образование пор в клеточной мембране.

ЭМБРИОИДОГЕНЕЗ — процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) неполовым путем в культуре тканей и клеток *in vitro*.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ — фенотипическое выражение дифференциальной активности генов. От мутаций и соматоклональных вариаций отличаются тем, что не сохраняются в цикле клетка — растение — клетка.

ЭУПЛОИД — ядро, клетки, организм с числом хромосом, кратным X .

ЮВЕНИЛЬНАЯ ФАЗА РАЗВИТИЯ — период заложения, роста и развития вегетативных органов от прорастания семени или вегетативной почки до появления способности к образованию репродуктивных органов.

АТТ-САЙТЫ — участки фаговой и бактериальной хромосом, рекомбинация между которыми приводит к интеграции или исключению фага.

СААТ — участок консервативной последовательности, расположенный примерно на расстоянии 75 пар оснований перед стартовой точкой в транскрипционных единицах эукариот.

G-БЕЛКИ — регуляторные белки, активирующие фермент, синтезирующий вторичный посредник.

EX VIVO — получение изолированных клеток, исправление в них генетического дефекта с помощью переноса нужного гена, наращивание «исправленных» клеток.

IN SITU — сохранение культивируемых видов в той среде, в которой они приобрели свои отличительные свойства.

IN VITRO — выращивание живого материала «в стекле», на искусственных питательных средах, в стерильных условиях.

IN VIVO — выращивание живого материала в естественных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

Абелев Г.И. Моноклональные антитела // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 1. С. 16–20.

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1–3.

Анализ генома. Методы / Под ред. К. Дейвиса. М.: Мир, 1990. 246 с.

Баранов В.С. Генная терапия — медицина XXI века // Соросовский образовательный журнал. 1999. № 3. С. 3–68.

Бекер М.Е., Лиепиньш Г.К., Райпулис Е.П. Биотехнология. М.: Агропромиздат, 1990. 334 с.

Биотехнология растений: культура клеток. М.: Агропромиздат, 1989. 280 с.

Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. 301 с.

Биотехнология / Под ред. А.А. Баева. М.: Наука, 1984. 309 с.

Бирюков В.С. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС, 2004. 296 с.

Будников Г.К. Биосенсоры как новый тип аналитических устройств // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 12. С. 26–32.

Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБк-Пресс, 1999, 259 с.

Варфоломеев С.Д. Биосенсоры // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 1. С. 45–49.

Вудворд Дж. Иммуобилизованные клетки и ферменты: Пер. с англ. М.: Мир, 1988. 215 с.

Галынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И., Потехина Т.С. Фармацевтическая микробиология. М.: Арнебия, 2003. 252 с.

Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 6. С. 3–8.

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. 589 с.

Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. Минск: Тэхналогія, 2003. 494 с.

Егоров Н.С., Самуилов В.Д. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов // Биотехнология. Кн. 2. М.: Высшая школа, 1988. 208 с.

Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Высшая школа, 1986. 448 с.

Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. М.: Академия, 2005. 208 с.

Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: КолосС, 2006. 144 с.

Кантере В.М. Теоретические основы технологии микробиологических производств. М.: Агропромиздат, 1990. 272 с.

Кларк Д., Рассел Л. Молекулярная биология: простой и занимательный подход. М.: ЗАО Компания КОНД, 2004. 472 с.

Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия. М.: Дрофа, 2004. 640 с.

Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М.: Академия, 2003. 400 с.

Корочкин Л.И. Клонирование животных // Соросовский образовательный журнал. 1999. № 4. С. 10–16.

Кузьмина Н.А. Культура клеток и тканей растений. Омск: ОмГПУ, 1999. 79 с.

Кулаев И.С. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 3. С. 23–31.

Лещинская И.Б. Генетическая инженерия // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 1. С. 33–39.

Лещинская И.Б. Современная промышленная микробиология // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 4. С. 14–18.

Лобанюк А.Г., Астапович Н.И., Михайлова Р.В. Биотехнология микробных ферментов. Минск: Наука и техника, 1989. 205 с.

Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2003. 227 с.

Лутова Л.А. Генетическая инженерия: свершения и надежды // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 10. С. 10–17.

Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987. 544 с.

Машкина О.С., Буторина А.К. Генетическая инженерия и биобезопасность. Воронеж: ВГУ, 2005. 71 с.

Мирзабеков А.Д., Прокопенко Д.В., Чечеткин В.Р. Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и медицине // Информационные медико-биологические технологии / Под ред. В.А. Княжева, К.В. Судакова. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. С. 166–198.

Основы молекулярной медицины: В 2 т.: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Джеймсона. М.: Мир, 2002. Т. 1. 444 с.; Т. 2. 346 с.

Пирузян Э.С. Основы генетической инженерии растений. М.: Наука, 1988. 304 с.

Пирузян Э.С. Проблемы экспрессии чужеродных генов в растениях // Итоги науки и техники ВИНТИ. 1990. Т. 23. 176 с. (Серия «Биотехнология»).

Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л. и др. Основы фармацевтической биотехнологии. Ростов/н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. 256 с.

Рис Э., Стенберг М. Введение в молекулярную биологию. От клеток к атомам. М.: Мир, 2002. 142 с.

Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. М.: Мир, 1987. 411 с.

- Сергеев Г.Б.* Нанохимия. М.: КДУ, 2007. 336 с.
- Сингер М., Берг П.* Гены и геномы. М.: Мир, 1998. Т. 1–2.
- Современная микробиология: В 2 т.: Пер. с англ. / Под ред. Г. Шлегеля. М.: Мир, 2002.
- Сойфер В.Н.* Международный проект «Геном человека» // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 12. С. 4–11.
- Спирин А.С.* Современная биология и биологическая безопасность // Вестник РАН. 1997. Т. 67. № 7. С. 579–588.
- Тейлор Д., Грин Н., Стаут У.* Биология: В 3 т. М.: Мир, 2002. 436 с.
- Фаворова О.О.* Лечение генами — фантастика или реальность? // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 2. С. 21–27.
- Хиггинс И., Бест Д., Джонс Дж.* Биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 1988. 480 с.
- Шевелуха В.С., Калашикова Е.А., Дегтярев С.В.* Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Высшая школа, 1998. 416 с.
- Юрин В.М.* Основы ксенобиологии. Минск: Новое знание, 2002. 267 с.

Дополнительная

- Артамонов В.И.* Биотехнология — агропромышленному комплексу. М.: Наука, 1989. 160 с.
- Атанасов А.* Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск: ИЦиГСО РАН, 1993. 241 с.
- Бейли Дж., Оллис Д.* Основы биохимической инженерии: В 2 т. М.: Мир, 1989. 592 с.
- Беккужина С.С., Никифорова И.Д.* Клональное размножение и тестирование на солеустойчивость растений-регенерантов яровой пшеницы // Новые методы биотехнологии растений: Тезисы II Российского симпозиума. Пуцуино, 1993. С. 113.
- Везин И.В., Клесов А.А., Швядас В.К.* и др. Инженерная энзимология // Биотехнология. Кн. 8. М.: Высшая школа, 1987. 143 с.

Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашев А.В. Иммуобилизованные ферменты. М.: Высшая школа, 1987. 160 с.

Биосенсоры: основы и приложения / Под ред. Э. Тернера и др. М.: Мир, 1992. 614 с.

Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. М.: Наука, 1985. 292 с.

Борнман Х. Реконструкция клеток растений: Brassica в качестве объекта изучения // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М.: Наука, 1991. С. 85–95.

Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. 417 с.

Будников Г.К., Майстренко В.Н., Муринов Ю.И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрорэлектродами. М.: Наука, 1994. 239 с.

Бутенко Р.Г. Изолированные протопласты растений — объект и модель для физиологических исследований // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С. 69–84.

Бутенко Р.Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 3–20.

Вакула В.А. Биотехнология, что это такое? М.: Молодая гвардия, 1989. 302 с.

Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений. Алма-Аты: Конжык, 1996. 272 с.

Высоцкая О.Н. Длительное сохранение *in vitro* коллекции растений земляники // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 6. С. 935–941.

Герасименко В.Г. Биотехнология. Киев: Вища школа, 1989. 343 с.

Глеба Ю.Ю., Зубко М.К. Теоретические и прикладные аспекты клеточной инженерии растений // Биотехнология. Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ АН СССР, 1988. Т. 9. С. 3–72.

Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука, 1993. 273 с.

Каравайко Г.И. Биогeотехнология металлов // Биотехнология. М.: Наука, 1984.

Кефели В.И., Дмитриева Г.А. Биотехнология: курс лекций. Пущино, 1989. 96 с.

Константинова Т.Н., Аксенова Н.П., Сергеева Л.И., Чайлахян М.Х. Взаимное влияние света и гормонов на регуляцию морфогенетических процессов в культуре *in vitro* // Физиология растений. 1998. Т. 34. № 4. С. 795–802.

Кузьмина Н.А. Культура клеток и тканей растений. Омск: ОмГПУ, 1999. 79 с.

Ли А., Тинланд Б. Интеграция т-ДНК в геном растений: прототип и реальность // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 3. С. 354–359.

Лобанюк А.Г., Астапович Н.И., Михайлова Р.В. Биотехнология микробных ферментов. Минск: Наука и техника, 1989. 205 с.

Ловкова М.Я. Биосинтез и метаболизм алкалоидов в растениях. М.: Наука, 1981. 168 с.

Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология. М.: Наука, 1991. С. 5–19.

Попов А.С. Криоконсервация клеток растений // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 70–77.

Родин А.Р., Калашникова Е.А. Использование методов клеточной и генной инженерии для получения посадочного материала древесных пород. М.: МГУЛ, 1993. 90 с.

Романов Г.А. Генетическая инженерия растений и пути решения проблемы биобезопасности // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 3. С. 343–353.

Романов Г.А. Репортерные гены для генетической инженерии растений: характеристика и методы тестирования // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 3. С. 479–488.

Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммуобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1994. 288 с.

Спир Р.Е., Адамс Г.Д., Гриффитс Дж. Б. и др. Биотехнология клеток животных: В 2 т. М.: Агропромиздат, 1989.

Теппер С.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004. 256 с.

Уайт Ф.Р. Культура растительных тканей. М.: Иностранная литература, 1949. 160 с.

Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. М.: Мир, 1989. 318 с.

Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Ч. 1. Новосибирск: Изд-во Новосибирского ун-та, 1994. 304 с.

Учебное издание

**Загоскина Наталья Викторовна,
Назаренко Людмила Владимировна,
Калашникова Елена Анатольевна,
Живухина Елена Александровна**

Биотехнология: теория и практика

Учебное пособие для вузов

Заведующая редакцией Л.В. Дудник

Редактор Т.И. Балашова

Дизайн обложки С.В. Меркулов

Художественный редактор С.В. Меркулов

Технический редактор Л.А. Данкова

Корректор Е.В. Туманова

Компьютерная верстка ООО «Бета-Фрейм»

Общероссийский классификатор продукции
ОК-005-93, том 2; 953005 — литература учебная

Подписано в печать 25.08.2009. Формат 60x90¹/₁₆
Печать офсетная. Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. 31,0
Тираж 3000 экз. Заказ № 0914160

ООО «Издательство Оникс»

105082, Москва, ул. Б. Почтовая, д. 7, стр. 1

Отдел реализации: тел. (499) 124-34-28, 129-07-27, 129-07-72

Интернет-магазин: www.onyx.ru



Отпечатано в полном соответствии с качеством
предоставленного электронного оригинал-макета
в ОАО «Ярославский полиграфкомбинат»
150049, Ярославль, ул. Свободы, 97