

Саратовский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского

В.А. Спивак, О.Ю. Ксенофонтова, Е.И. Тихомирова

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебное пособие к практическим занятиям
для студентов биологического факультета
специальность 020400 - биология

УДК 581.16(075.8)

Спивак В.А, О.Ю. Ксенофонтова, Тихомирова Е.И.

Основы биотехнологии: Учеб. пособие. - Саратов: СГУ, 2015. -86 с.

В учебном пособии приводится рабочая программа курса «Биотехнология», составленная в соответствии с учебным планом по специальности 020400 – биология. В пособии изложены основные положения теоретического раздела программы, планы практических занятий и перечень вопросов для индивидуальной и самостоятельной работы студентов. В теоретическом разделе даются представления об основных направлениях современной биотехнологии, методах создания промышленных штаммов микроорганизмов, клеточной инженерии, процессах культивирования микроорганизмов, тканей и органов растений, а также требования к биотехнологическому производству.

Для студентов биологического факультета университета, изучающих общий курс биотехнологии.

Рекомендуют к печати:

Кафедра микробиологии и физиологии растений
Биологического факультета Саратовского государственного университета
имени Н.Г. Чернышевского

Доктор биологических наук С.А.Коннова
(Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского)

Печатается по решению Ученого совета биологического факультета
Саратовского государственного университета

УДК 581.16(075.8)

© Спивак В.А., Ксенофонтова О.Ю.,
Тихомирова Е.И.

2015

Всегда практика должна быть воздвигнута на хорошей теории, вождь и врата которой - перспектива.

Леонардо да Винчи

ВВЕДЕНИЕ

С древних времен известны отдельные биотехнологические процессы, используемые в различных сферах практической деятельности человека. К ним относятся хлебопечение, виноделие, приготовление кисломолочных продуктов и т. д. Однако биологическая сущность этих процессов была выяснена лишь в XIX в., благодаря работам Л. Пастера. В первой половине XX века сфера приложения биотехнологии пополнилась микробиологическим производством ацетона и бутанола, антибиотиков, органических кислот, витаминов, кормового белка.

Значительные успехи, достигнутые во второй половине XX в. в фундаментальных исследованиях в области биохимии, биоорганической химии и молекулярной биологии, создали предпосылки для управления элементарными механизмами жизнедеятельности клетки, что явилось мощным импульсом для развития биотехнологии. Выяснение роли нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации, расшифровка генетического кода, раскрытие механизма индукции и репрессии генов, совершенствование технологии культивирования микроорганизмов, клеток и тканей растений и животных позволили разработать методы генетической и клеточной инженерии, с помощью которых можно искусственно создавать новые формы высокопродуктивных организмов. Генетическая и клеточная инженерия рассматривается как принципиально новое направление биологической науки, которое сегодня ставят в один ряд с расщеплением атома, преодолением земного притяжения и созданием средств электроники (Ю.А. Овчинников, 1985).

В разработку генноинженерных методов отечественные исследователи включились в 1972 г. с успешным осуществлением проекта “Ревертаза” - получения в промышленных масштабах обратной транскриптазы.

В настоящее время ведутся интенсивные исследования по селекции культур для непрерывного культивирования в промышленных целях. Развитие методов для изучения структуры белков, выяснение механизмов функционирования и регуляции активности ферментов открыли путь к направленной модификации белков и привели к рождению инженерной энзимологии.

Все эти достижения поставили биотехнологию на новый уровень, качественно отличающийся от прежнего возможностью сознательно управлять клеточными процессами. В современном звучании биотехнология — это *промышленное использование биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами.*

По современным представлениям биотехнология растений является молодым и перспективным направлением в ряду важнейших технологий XX века. Данное направление представляет собой соединение методов культуры клеток и тканей растений с методами молекулярной биологии и техникой рекомбинантных ДНК. Новая экспериментально созданная система - клетки и ткани растений, выращиваемые вне организма на искусственных и питательных средах в строго контролируемых условиях - позволяет создать принципиально новые клеточные технологии для промышленности и сельского хозяйства.

Культивируемые клетки и ткани высших растений обладают рядом уникальных особенностей, отличающих их от выращиваемых в искусственных условиях клеток животных или микроорганизмов. Их можно выращивать в виде неорганизованной клеточной массы, способной

переходить от размножения и роста к синтезу видоспецифичных хозяйственно важных соединений и заменять растительное сырье, получаемое от дикорастущих и культурных растений. Выбирая в качестве объекта для получения растений либо интегрированную систему (изолированный зародыш, меристему апикальных или пазушных почек), либо изолированные клетки и протопласты, биолог, физиолог растений создает принципиально разные технологии.

Биотехнология считается отраслью века грядущего и, по мнению специалистов промышленно развитых стран мира, способна принести в этих странах прибыли, какие не дадут такие отрасли, как телекоммуникация, электроника, банковское дело.

Биотехнология - междисциплинарная область научно-технического прогресса, возникшая на стыке биологических, химических и технических наук. Из биологических наук безусловно для успешного усвоения курса биотехнологии необходимы знания микробиологии, биохимии и биофизики, генетики, физиологии и др. дисциплин.

Данный практикум ставит своей целью ознакомить с некоторыми методами биотехнологического производства и дать навыки в технике лабораторных работ на базе микробиологии и физиологии растений.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА КУРСА

«БИОТЕХНОЛОГИЯ»

ЛЕКЦИОННЫЙ КУРС – 24 часа

1. БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА

Тема 1. Введение в специальность. Биотехнология как научная дисциплина, цели и задачи биотехнологии, объекты и методы биотехнологии. Фитобиотехнология и зообиотехнология; технологическая биоэнергетика; биотехнология и медицина; биотехнология и ветеринария; биотехнология и пищевая промышленность; техническая микробиология, биогеотехнология.

2. ОРГАНИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Тема 2. Культивирование биологических объектов. Подготовка биологических объектов: подбор объектов; селекция; популяционная устойчивость биологических объектов. Взаимосвязь процессов и биообъектов. Субстраты для культивирования биообъектов; принципы действия и конструкции биореакторов; лабораторные, пилотные и промышленные биореакторы; проблемы масштабирования.

Биотехнологические процессы и аппараты периодического и непрерывного действия; специализированные типы биотехнологических процессов и аппаратов.

Получение конечного продукта; отделение биомассы от культуральной жидкости; методы разрушения клеток; отделение и очистка; концентрирование; обезвоживание; пути модификации; стабилизация, безопасность продукта.

Тема 3. Имобилизованные ферменты и биокаталитические системы: методы иммобилизации; реакторы для процессов с применением иммобилизованных биокатализаторов; основные типы иммобилизованных

биокаталитических систем.

3. ОСНОВЫ ФИТОБИОТЕХНОЛОГИИ

Тема 4. Вегетативное размножение растений методом культур тканей.

Способы культивирования клеток растений. Использование методов генной инженерии в фитобиотехнологии. Аппаратурное оснащение фитобиотехнологических производств.

4. ПРОМЫШЛЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Тема 5. Микробиологические производства, основанные на получении микробной биомассы. Принципиальная технологическая схема получения микробного белка, возможные сырьевые базы промышленного производства. Получение белковых продуктов микробного происхождения, гликанов и гликоконъюгантов, полиоксибутирата.

Получение энтомопатогенных препаратов (бактериальных, вирусных, грибных), особенности организации производства.

Тема 6. Получение микробных иммунобиологических препаратов. Особенности организации производства получения вакцин из клеток патогенных микробов (вакцины живые, убитые, полисахаридные, рибосомальные, вирусные, субъединичные, генно-инженерные, вакцины из продуктов метаболизма патогенных бактерий). Токсины и анатоксины, варианты специфических профилактических и лечебных иммунных препаратов. Производство диагностикумов, аллергенов, бактериофагов.

Тема 7. Производства, основанные на получении микробных метаболитов. Понятие о первичных и вторичных метаболитах. Технологии биосинтеза аминокислот, ферментов, антибиотиков, витаминов.

Тема 8. Промышленные штаммы микроорганизмов и способы их усовершенствования. Понятие о клоне клеток и штамме, требования к производственным штаммам, понятие о сверхсинтезе. Стратегия

селекционной работы с микроорганизмами; методы селекции микроорганизмов. Генетическое конструирование *in vivo* (перенос генетической информации: конъюгация, трансдукция, трансформация и трансфекция, отбор штаммов конъюгантов, трансдуктантов и трансформантов.

Тема 9. Генетическое конструирование штаммов-продуцентов *in vitro*.

Источники ДНК для клонирования; система рестрикции - модификации у прокариотических клеток, рестриктазы и их применение; методы воссоединения фрагментов ДНК, понятие о векторных молекулах; методы идентификации клонов, содержащих рекомбинантные молекулы. Экспрессия чужеродных генов в микроорганизмах. Технология получения человеческого интерферона. Перспективы развития генной инженерии.

Тема 10. Микробная трансформация органических соединений.

Понятие о микробной химии. Методы проведения процессов микробиологических трансформаций. Микробиологическая трансформация стероидов, углеводов, гетероциклических соединений.

Тема 11. Метаболическая инженерия. Основные принципы регуляции

метаболизма и скорости роста микроорганизмов. Регуляция на уровне биосинтеза белков (регуляция репликации ДНК, процесса транскрипции, процесса трансляции, посттрансляционная модификация, регуляция путем избирательного протеолиза). Регуляция активности готовых белковых посредников. Организация и регуляция транспортных процессов. Регуляция клеточного деления. Выявление «узких» мест в метаболизме клетки.

5. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Тема 12. Метаболически замкнутые биотехнологические процессы.

Методы очистки отходов производства, использование специфических биологических сообществ, понятие о живых консорциумах и активном иле. Состав биоценозов биологических прудов и биофильтров.

Тема 13. Способы очистки сточных вод. Общие показатели загрязненности сточных вод. Аэробные процессы биохимической очистки сточных вод, принцип работы аэротенков, Очистка сточных вод с использованием биофильтров, биологических прудов, полей фильтрации и орошения. Анаэробные процессы переработки отходов в метантенках. Формирование микробиоценоза метантенка. Использование биосенсерных систем.

ПРАКТИЧЕСКИЙ КУРС – 24 часа

1. ОСНОВЫ ФИТОБИОТЕХНОЛОГИИ

Микроклональное размножение и оздоровление растений

Лабораторное занятие № 1. Получение безвирусных растений с помощью культуры апикальных меристем побега.

Задание: Выделить и пассировать в условиях *in vitro* апексы побегов.

Лабораторное занятие № 2. Получение каллусов из стеблевой части ценных видов, пород и сортов растений.

Задание. Получить на экспланте активно растущую каллусную ткань.

Лабораторное занятие № 3. Культивирование первичного каллуса на агаризованной питательной среде

Задание: Получить активно растущую каллусную культуру.

Лабораторное занятие № 4. Регенерация растений из эксплантов путем прямого органогенеза (на примере *Begonia*).

Задание: Получить растения путем прямого органогенеза из культивируемых эксплантов.

2. МЕТОДЫ ТЕХНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Биотехнология получения первичных метаболитов

Лабораторное занятие № 5. Отбор штаммов - продуцентов экзополисахаридов, имеющих промышленное значение.

Задание: определить продукцию экзополисахарида культурами микроорганизмов. Оценить промышленно ценные свойства выделенного полисахарида.

Лабораторное занятие № 6. Изучение биосинтеза витамина В₁₂ азотобактером.

Задание: Определить способность азотобактера к образованию витамина В₁₂ (цианкобаламина), используя в качестве тест-объекта чувствительную к витамину культуру *E.coli* штамм 113-3. Оценить количественно содержание цианкобаламина в фильтрате бульонной культуры азотобактера по калибровочной шкале.

Биотехнология получения вторичных метаболитов

Лабораторное занятие № 7. Определение спектра антибиотического действия штаммов актиномицетов.

Задание: определить продукцию антибиотикоподобного вещества культурой актиномицета. Оценить антибактериальную активность актиномицета по отношению к тест-культурам Г⁺ и Г⁻ бактерий.

3. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Лабораторное занятие № 8. Передача F-фактора при конъюгации бактерий.

Задание: выявить частоту образования трансконъюгантов при передаче фактора фертильности от штамма-донора *E.coli* К 13(lac⁺,F⁺) штамму-реципиенту *E.coli* К 12 (lac⁻, F⁻).

Лабораторное занятие № 9. Передача хромосомных маркеров при конъюгации бактерий.

Задание: выявить частоту передачи хромосомного маркера lac⁺ от штамма-донора *E. coli* Hfr C (lac⁺, Str⁻) штамму - реципиенту *E. coli* К 12 (lac⁻ - Str⁺).

Лабораторное занятие № 10. Передача R-фактора при конъюгации бактерий.

Задание: выявить частоту передачи R –фактора от штамма – донора *E.coli* M1 7 (lac⁺,T⁺,L⁺,Str⁻) штамму-реципиенту *E.coli* K 12 (lac⁻,T⁻,L⁻,StT⁺). Определить наличие и % трансконъюгантов.

4. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Выделение штаммов – деструкторов ксенобиотиков

Лабораторное занятие № 11. Изучение действия пестицидов на численность микроорганизмов в почве.

Задание: Выявить динамику численности почвенных микроорганизмов под действием различных доз пестицидов и выделить из проб почв микроорганизмы, относящиеся к различным систематико-физиологическим группам, и оценить действие на них исследуемого пестицида.

Лабораторное занятие № 12. Определение чувствительности микроорганизмов к пестицидам.

Задание: определить степень чувствительности чистых культур коллекционных микроорганизмов к изучаемому пестициду и отобрать перспективные штаммы в качестве деструкторов.

Лабораторное занятие № 13. Определение способности использования микроорганизмами углерода из пестицидов.

Задание. Выявить способность микроорганизмов усваивать углерод из субстрата.

Лабораторное занятие № 14. Изучение деструктивного влияния микроорганизмов на пестициды.

Задание. Изучить деструктивную активность штаммов микроорганизмов по отношению к пестициду.

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЙ КУРС – 22 часа

Тема 1. Традиционные микробиотехнологические процессы

Получение продуктов брожения микроорганизмов.

Организация производств, основанных на спиртовом брожении микроорганизмов (получение промышленного спирта, пивоварение, виноделие), требования к производственным штаммам дрожжей, использование спиртового брожения в хлебопечении.

Молочнокислородное брожение и производство молочнокислых продуктов.

Пропионовокислородное брожение и производство сыра.

Маслянокислородное брожение и получение масляной кислоты.

Уксуснокислородное брожение и варианты производства уксусной кислоты.

Ацетонобутиловое брожение и особенности его промышленного использования.

Тема 2. Производства, основанные на неполном окислении углеводов микроорганизмами

Получение органических кислот, особенности организации производства лимонной кислоты, глюконовой, фумаровой, итаконовой.

Тема 3. Технология производства бактериальных удобрений

Характеристика микроорганизмов, используемых в биоудобрениях. Технология производства препаратов. Основные биоудобрения, используемые в сельском хозяйстве. Преимущества и недостатки применения биоудобрений.

I. ОСНОВЫ ФИТОБИОТЕХНОЛОГИИ

1.1. Методы культуры изолированных частей растений различного уровня организации в биотехнологическом производстве

При производстве посадочного материала ценных растений определенного клона, сохранении редких, исчезающих видов или при получении новых сортов и видов, а также лекарственного сырья, часто бывает недостаточно использование тех методов воспроизведения и получения растений, которыми человечество пользовалось веками. Изменяющиеся производственные условия и возрастающие потребности человечества в продуктах питания, источниках энергии и лекарств требуют новых более эффективных методов и технологий. Предлагаемые к рассмотрению и освоению методы культуры изолированных частей растений относятся к разряду таких технологий.

Клональное микроразмножение *in vitro* — биотехнологический процесс, направленный на быстрое получение вегетативно размноженных идентичных растений из различных структурных образований, таких как почки, апексы побега, эмбриогенные каллусы. Преимуществами данного способа размножения растений, по сравнению с традиционными вегетативными методами, является высокий коэффициент размножения, по расчётам достигающий 10^5 - 10^7 мериклонов в год, тогда как за этот же срок от одного исходного маточного растения обычным черенкованием получают — 5-100 растений. Коэффициент размножения зависит от ряда факторов:

- генотипа растения-донора и его физиологического состояния;
- состава питательной среды и физических условий в культуральном сосуде и вне его (освещении, влажности, газовый состав и др.);
- уровня стабильности процесса размножения при субкультивировании образовавшихся мериклонов;
- соблюдения асептических условий выращивания с особым вниманием к

хронической инфекции, вызываемой медленно растущими патогенами (*Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus*).

Оздоровление посадочного материала от нематод, грибов, бактерий, вирусов вызывающих болезни растений, осуществляется любыми незаражёнными живыми фрагментами организма растений. От вирусов удаётся освободиться и получить безвирусные растения только при использовании в качестве первичного экспланта апикальные меристемы побега. Большим преимуществом данной технологии является то обстоятельство, что в условиях *in vitro* часто размножаются и укореняются те растения, которые либо совсем не размножаются или плохо размножаются обычными способами. Обязательным условием клонального микроразмножения является использование объектов, полностью сохраняющих генетическую стабильность на всех этапах процесса, от экспланта до растений высаженных в поле. Этому условию удовлетворяют апексы и пазушные почки стеблевого происхождения.

Непременным условием любой технологии является наличие и становление собственной терминологии. С целью ознакомления и понимания значения специализированных слов и выражений представляем краткий словарь.

Термины и выражения, используемые в биотехнологии растений

Адвентивные почки — почки, возникшие из тканей и клеток в растениях, обычно их не образующих.

Андрогенез — процесс возникновения растения из микроспоры или пыльцевого зерна либо через гаметический эмбриогенез, либо с образованием каллуса.

Анеуплоид — ядро, клетка, организм с числом хромом отклоняющимся от X и от чисел, кратных X .

Апикальное доминирование — явление подавления роста боковых почек побега в присутствии терминальной меристемы.

Время генерации клетки — интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями.

Время удвоения популяции — интервал времени, за который число клеток в популяциях увеличивается вдвое.

Гаплоид — ядро, клетка, организм, характеризующиеся набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду (символ n).

Гемморизогенез — тип органогенеза, состоящий в формировании почки (*getta*) и корня (*rhizos*).

Гиногенез — процесс возникновения растения из клеток зародышевого мешка.

Дедифференциация — переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации.

Диплоид — ядро, клетка, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленным числом, характерным для данного вида (символ $2n$).

Дифференцировка — состояние специализации клеток, отличающее их от других.

Дифференциация — комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

Доминант — ген, проявляющийся как признак при условии, когда гомологичные наборы имеют разные гены.

Изолированный протопласт — растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Инокулюм или трансплант — часть суспензионной или каллусной

культуры, используемая для пересадки в или на свежую питательную среду.

Каллус — всякое «внеоргановое»* образование на поверхности ранения (Кренке Н.П.); раневая ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений; — гетерогенная интегрированная структура (система) образующаяся в результате пролиферации клеток на поверхности отдельных структур растительного организма (Батыгина Т.Б.).

*) образование, которое, по его устройству и функциям, нельзя отнести к какому либо определённом органу.

Кариотип — набор хромосом, характерный для данного вида.

Клеточная селекция — метод выделения мутантных клеток соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.

Клон — культура, возникшая из одной клетки.

Клональное микроразмножение — получение *in vitro*, неполовым путем растений, генетически идентичных исходному.

Культура зародышей — стерильное выращивание на питательной среде незрелых или зрелых изолированных зародышей.

Культура изолированных протопластов — выращивание клеток, лишенных клеточных стенок, в жидкой или на агаризованной питательной среде, содержащей в качестве дополнительного компонента осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации. При регенерации стенок у изолированных протопластов превращается в культуру клеток.

Культура каллусных тканей — выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных фрагментов органов или самих органов (пыльники, семязпочки и т. д.) растений.

Культура клеток (суспензионная культура) — выращивание отдельных клеток или небольших групп их во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и

перемешивание.

Культура корней — асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней.

Культура меристем побега — асептическое выращивание на питательной среде изолированного из апекса или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями.

Культура опухолевых тканей — выращивание в длительной, культуре фрагментов, изолированных из растительных опухолей разного происхождения и освобожденных от патогенов, индуцировавших развитие опухоли.

Культура отдельных клеток — выращивание одиночных клеток при низкой плотности посева: на очень богатых питательных средах, с помощью культуры-«няньки» или питающего слоя.

Культура эксплантов — инкубация в стерильных условиях на питательных средах, вызывающих или не вызывающих пролиферацию фрагментов, изолированных из разных органов растений.

Линия — культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

Моноплоид — ядро, клетка, организм, характеризующиеся основным числом хромосом в полиплоидной серии (символ X).

Мутация — изменение в генетическом материале клеток путем перестройки ДНК ядер и органелл, изменения структуры хромосом или путем полиплоидизации.

Органогенез — процесс возникновения *de novo* в неорганизованно растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней и побегов).

Плюрипотентность — способность клетки давать начало целому растению.

Полиплоид — ядро, клетка, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символы 3X, 4X и т.д.).

Пролиферация — новообразование клеток и тканей путем соматического деления.

Популяция клеток — совокупность культивируемых клеток.

Псевдодиплоид — ядро, клетка, организм, характеризующиеся диплоидным числом хромосом, отличающиеся от зиготы данного вида по кариотипу.

Редифференциация — переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

Рецессив — ген или генетически обусловленный признак, проявляющийся в диплоидной клетке или организме при условии, когда оба набора хромосом несут данные гены.

Ростовой цикл — рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризуется кривой Сакса. Фазы ростового цикла: латентная, экспоненциальная, замедления роста, стационарная, деградации.

Слияние изолированных протопластов — формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

Соматический эмбриогенез — процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре ткани и клеток путем, напоминающим нормальный зиготический эмбриогенез.

Сомаклональные вариации и варианты — фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органелльных геномов растительных клеток. От истинных генных мутаций отличаются большей частотой возникновения и комплексностью изменений (изменение в структуре генов, хромосом, геномов).

Соматическая (парасексуальная) гибридизация — система вовлекающая в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла; например, путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению гибридных клеточных линий и

соматических гибридов растений.

Соматический гибрид — растение, полученное путем гибридизации соматических клеток.

Субкультивирование — перенос инокулюма или транспланта в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Субпротопласт — изолированный протопласт, потерявший часть цитоплазмы, но сохранивший ядро.

Тотипотентность — свойство соматических клеток растений полностью реализовать свой потенциал развития, т. е. реализовать omnipotentность ядра с образованием целого организма.

Трансгеноз — перенос любым способом чужеродных генов в клетки растений.

Цибрид — растение, полученное при слиянии изолированного протопласта с цитопластом, протопластом с инактивированным ядром или с энуклеированным протопластом.

Цикл выращивания — период от помещения инокулюма или транспланта в свежую среду до последующего субкультивирования.

Цитопласт — ограниченный мембраной участок цитоплазмы, возникший при фрагментации изолированного протопласта.

Штамм — культура, возникшая после первого субкультивирования. Состоит из многих клеточных линий, возникших из клеток, присутствующих в первичной культуре.

Эксплант — фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

Эмбриоид — зародышеподобная структура, возникшая путем соматического эмбриогенеза.

Эпигенетические вариации — фенотипическое выражение дифференциальной активности генов. От мутаций и соматических клонов.

вариаций отличаются тем, что не сохраняются в цикле клетка – растение - клетка.

Эуплоид — ядро, клетка, организм с числом хромосом кратным X .

In situ — объект произрастающий в естественных условиях.

In vitro — выращивание живого материала осуществляемое «в стекле» (пробирках, колбах, банках), на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

In vivo — проведение эксперимента осуществляется на (или внутри) живой ткани при живом (целостном) организме.

В данном разделе разъясняются только основные общепринятые термины, используемые при культивировании частей растений и создании на их основе технологий для сельского хозяйства

Основные требования к введению различных частей растений в культуру in vitro

Процесс культивирования на питательной среде или в питательном растворе различных структур растения *in vitro* (от протопластов до органов и еще более сложных частей, например - почек, цветков и т.д.), можно разделить на четыре этапа.

I этап – подготовительный – включает:

- а) выбор растения-донора;
- б) изолирование и стерилизацию эксплантируемой части растения;
- в) создание условий для роста экспланта в условиях *in vitro* (подбирается питательная среда, рН, температурный и световой режимы и т.д.).

II этап – собственно размножение – состоит из:

- а) стимуляции роста и развития клеточных и тканевых структур экспланта, всех пазушных почек экспланта, посредством подавления апикального доминирования как первичного, так и всех вновь возникающих побегов;
- б) размножение клеток, каллуса, органов, зародышей, микрочеренкования

побегов и т.д.;

- в) стимуляция образования эмбриоидов микроклубней и микролуковичек;
- г) индукция образования адвентивных почек тканями листа, стебля, чешуйками и донцем луковиц, корневищем, зачатками соцветий и другими структурами (без образования сначала каллусной ткани).

III этап – укоренение размноженных побегов и адаптация пробирочных растений к условиям *in vitro*:

- а) культивирование растений на питательных средах стимулирующих рост корней;
- б) адаптация эксплантов к условиям произрастания при повышенном освещении и дефиците воды.

IV этап – адаптация и культивирование растений *in vivo*.

- а) выращивание извлеченных из культуральных сосудов растений в условиях защищенного грунта на различных субстратах;
- б) подготовка к реализации или высадке в почву.

Вначале рассмотрим более подробно основные составляющие некоторых проблем, с которыми придётся столкнуться при освоении технологии культивирования изолированных частей растений *in vitro*.

1.2. Основные сведения о стерилизующих веществах, питательных средах и их приготовлении

Обеззараживание вводимого в культуру *in vitro* растительного материала является одним из самых важных моментов в технологическом процессе, от которого зависит получение жизнеспособного и асептически чистого эксплантируемого материала.

Растворы, стерилизующие растительный материал

Успешное введение в культуру *in vitro* растительных структур и последующее культивирование их требует абсолютной асептики. Достигнуть

таких условий удается с помощью различных стерилизующих растворов, содержащих чаще всего активный хлор или ртуть (табл. 1).

Таблица 1

Стерилизация исходного растительного материала

Растительные объекты	Время стерилизации, мин			
	Диацид. 0,1 %	Сулема, 0,1 %	Гипохлориты Na, Ca, 5-9%	Перекись водорода, 10-12%
Семена сухие	15—20	10—15	15—20	12—15
Семена набухшие	6—10	6-8	10—15	6—8
Ткани мясистого корня	20—30	15—25	15—20	-
Ткани стебля	20—40	20—25	20—25	-
Листья	1—3	0,5—3	3—6	3-5
Апексы	1—10	0,5—7	3—15	2—7

При стерилизации растительных объектов необходимо соблюсти два условия: 1 – подобрать наиболее приемлемый стерилизующий раствор, чтобы достичь высокой асептики; 2 – найти такой режим стерилизации, чтобы объект после обработки оставался максимально жизнеспособным. Одним из эффективных стерилизующих веществ, для большинства объектов является диацид. Раствор диацида необходимо приготавливать следующим образом: отвесить 1 г этанолртутихлорида и 2 г цитилпиридиния бромид (или цитилпиридиния хлорида), предварительно растворить их отдельно в ~200 мл горячей воды или в небольшом количестве этилового спирта (5—10 мл), затем смешать и разбавить дистиллированной водой до нужной концентрации (табл. 2).

Следующим важным моментом в технологии культивирования изолированных частей растений является создание экзогенных условий для их роста и развития *in vitro*, поскольку экспланты на данный период времени, как правило, становятся гетеротрофными системами и временно лишены типичных структурных образований содержащие полноценные

Таблица 2

Приготовление различных концентраций диацида

Количество дистиллированной воды, л	Этанолртухурхлорид, г	Цатилпипрадиний бромид, г	Концентрация диацида
3	1	2	1:1000
6	1	2	1:2000
9	1	2	1:3000
15	1	2	1:5000

системы биосинтеза веществ. Основным фактором успешного роста эксплантов является состав питательной среде.

*Питательные среды, используемые при культивировании
эксплантов растений*

В результате продолжительного исторического периода создания питательных сред, для различных культивируемых частей растений, были найдены общие принципы составления и подбора компонентов (солей, витаминов, физиологически активных веществ, углеводов, экстрактов и т.д.). В настоящее время точно установлено, что экспланты различных видов, а порой и сортов растений предъявляют различные требования к составу питательных сред. Поэтому создать универсальную питательную среду не представляется возможным.

Подбор питательной среды для конкретного вида или сорта растения осуществляется одним из двух способов:

- 1) используется рекомендуемая среда для данного вида;
- 2) в отсутствии информации о составе питательной среды необходимой для культивирования данного вида растения *in vitro*, эмпирическим путем

проводят подбор среды или используют базовую (чаще - среда Мурасиге и Скуга) с учётом физиологических требований организма. При модификации среды прежде всего обращают внимание на сочетание NPK, соотношение NH_4 и NO_3 , а также на наличие и концентрацию регуляторов роста, как правило, ауксиновой и цитокининовой природы.

Компоненты любой питательной среды, используемой для выращивания изолированных эксплантов можно разделить на группы, как в порядке их приготовления, так и хранения в виде концентрированных исходных растворов или сухих порошков:

Основные неорганические питательные вещества

- 1) макроэлементы;
- 2) микроэлементы;
- 3) источник железа.

Важнейшие органические питательные вещества

- 1) витамины;
- 2) аминокислоты;
- 3) сахара;
- 4) регуляторы роста растений (фитогормоны, экстракты и др.);
- 5) отвердители (агар, агароза и др.).

В таблице 3 приведены наиболее эффективные питательные среды для различных групп растений и их частей.

Наиболее многоцелевой, пригодной для растительных клеток многих видов, и базовой при создании новых питательных сред, является среда Мурасиге и Скуга.

Таблица 3

Состав некоторых питательных сред, применяемых при культивировании тканей и органов растений

Компоненты сред	Концентрация веществ в средах по прописи, мг/л						
	Мурасиге и Скуга, (1962 г.)	Гамборга и Эве лега(B ₅) (1968 г.)	Уайта, (1939 г.)	Нич, (1974 г.)	Као и Михайлюка, (1975 г.)	№ ₆ , (1982г.)	АП, (1985 г.)
1	2	3	4	5	6	7	8
KNO ₃	1900	3000	80	950	1900	2830	—
NaNO ₃	—	—	—	—	—	—	2000
NH ₄ H ₂ PO ₄	—	—	—	—	—	—	400
NH ₄ NO ₃	1650	—	—	720	600	—	—
Ca(NO ₃) ₂	—	—	2085	—	—	—	—
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	—	—	—	—	—	—	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	134	—	—	—	463	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	360	185	300	185	400
CaCl ₂ ·H ₂ O	—	—	—	166	—	166	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	—	—	—	—	—
KCl	—	—	65	—	300	—	250
KH ₂ PO ₄	170	—	12	68	170	400	—
Na ₂ SO ₄	—	—	200	—	—	—	—
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	—	169,6	18,7	—	—	—	—
Mn SO ₄ ·H ₂ O	—	10	—	—	10	—	1
Mn SO ₄ ·4H ₂ O	22,3	13,2	7	25	—	4,4	—
Zn SO ₄ ·4H ₂ O	8,6	—	—	—	2	—	—
Zn SO ₄ ·7H ₂ O	—	2	3	10	—	1,5	3
H ₃ BO ₃	6,2	3	1,5	10	3,6	1,5	5
KJ	0,83	0,75	0,75	—	0,75	0,8	1
Cu SO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,001	0,025	0,025	—	0,2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,0025	0,25	0,25	—	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	—	—	0,025	—	0,1
Fe ₂ (SO ₄) ₃	—	—	2,5	—	2,46	—	—
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	—	27,8	27,8	27,8	—
Fe - цитрат	—	—	—	—	—	—	15
Na - EDTA·2H ₂ O	37,3	377,3	—	37,3	37,3	37,3	37,2
Мезоинозит	100	100	—	200	100	200	100
Аскорбиновая к-та	—	—	—	3	—	3	10
Тиамин-НСl	0,4	10	0,1	3	0,005	3	10
Пиридоксин-НСl	0,5	1	0,5	1	0,005	1	1
Никотиновая к-та	0,5	1	0,5	—	—	—	5
Глицин	2	—	3	—	—	—	10
Тирозин	—	—	—	—	—	—	60

Окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6	7	8
Гидролизат казеина	10000	—	—	400	—	400	—
Са - пантотенат	—	—	—	—	—	—	0,25
Кинетин	*	*	*	—	—	—	—
БАП	*	*	*	6	—	6	—
НУК	*	*	*	2	—	2	—
2,4-Д	*	*	*	—	0,2	—	—
2,4,5 - Т	—	—	—	—	—	—	*
Сахароза	30000	20000	20000	60000	125	60000	10000
Глюкоза	—	—	—	—	—	—	10000
Агар «Дифко»	—	—	—	7000	—	7000	7000

Примечания: Среда Као и Михайлюка содержит дополнительно (мг/л): фруктозы, рибозы, ксилозы, маннозы, рамнозы, целлобиозы, сорбита - по 125,0; маннита, никотинамида, аскорбиновой кислоты - по 1,0; витамина А – 10,0; витамина D₃ - 0,5; Са-пантотената - 0,01; витамина В₁₂ - 0,2; биотина - 0,005; п-аминобензойной кислоты - 0,01; холинхлорида - 0,5; рибофлавина - 0,1; 2,4-Д - 0,2; зеатина - 0,5; НУК – 1,0; гидролизата казеина – 125,0; глюкозы -68400; пирувата Na – 5,0; лимонной, яблочной и фумаровой кислот - по 10,0; кокосового молока – 10 мл; СаСl₂ (30 %) - 1,5 мл.

* Состав экзогенных гормональных препаратов варьирует в зависимости от цели и объектов.

Хорошие результаты она дает при каллусообразовании большинства растений, успешно поддерживает неорганизованный рост каллуса и вызывает индукцию морфогенеза у большинства двудольных видов. Как правило, для клонального микроразмножения на первом и втором этапах используют среду по прописи Мурасиге и Скуга, варьируя составом и сочетанием стимуляторов роста, в зависимости от объекта.

Среда Гамборга и Эвелеге (среда В₅) дает хорошие результаты при культивировании клеток и тканей бобовых растений. Среда Уайта применяется для укоренения побегов и нормального роста стеблевой части после регенерации. Среда Нич, китайская среда N₆ рекомендуются для индукции андрогенеза в культуре пыльников и для индукции морфогенеза у злаков. Среда Као и Михайлюка используется для культивирования

единичных (или с малой плотностью высева) изолированных протопластов и клеток. Среда АП применяется при культивировании апексов побегов злаковых растений.

Следует учесть, что какой бы хороший состав питательной среды не был, эффективность его действия определяется во многом рН раствора.

Роль рН питательных растворов. Успех культивирования изолированных частей растений на питательных средах зависит не только от химического состава среды, но и от рН питательного раствора. Обязательно следует учитывать предъявляемые к этому показателю требования растения, а они у каждого вида разные (табл. 4).

Показатели оптимальных значений рН для культуры кончиков корней некоторых растений:

Горох, вика, морковь, перец	4,8—5,2
Томаты	4,6—4,9
Сосна	5,4
Крестовник	4,5—4,7
Акация белая	4,4—4,8
Клевер красный	4,9—5,0
Пшеница	4,9—5,0

Величину рН обычно устанавливают до автоклавирования среды. По данным А. М. Смирнова (1970), в процессе автоклавирования питательная смесь незначительно подкисляется. При культивировании корней, каллусов и клеток на средах раствор слабо подщелачивается. Еженедельный пересев культуры корней на свежую питательную среду обеспечивает стабильность реакции среды. После того, как в питательной среде будет установлена необходимая величина рН, она готова для разлива в культуральные сосуды (колбы, пробирки, чашки Петри, банки).

Все фрагменты растений, используемые при культивировании *in vitro*,

нуждаются в присутствии кислорода для осуществления дыхания. С этой целью необходимо либо насыщать раствор кислородом, либо культивировать на отвердителях питательных растворов, чаще агар-агаре.

Твердая питательная среда. Приготовление твердой питательной среды заключается в добавлении в питательный раствор 7 - 10 г/л тщательно очищенного агар-агара после установления рН среды. Поступающий в продажу агар-агар, экстрагированный из красных морских водорослей, **плохо очищен!** В нем могут содержаться ростовые вещества, минеральные соли, всевозможные органические примеси. Поэтому при закладке опытов на агаризированной питательной среде его следует тщательно очистить.

Существует ряд способов очистки агар-агара. Агар обрабатывают пиридином (**вещество ядовито!**) не менее суток, затем на 48 ч помещают его в вакуум при 60°C. Эта трудоемкая и длительная работа, которую необходимо проводить в вытяжном шкафу, гарантирует очистку агара в основном от органических примесей. Поэтому более широко распространена очистка агара длительным промыванием водой, которая используется в нашей работе. Необходимую для опыта навеску агара помещают в трехлитровый сосуд и заливают водопроводной водой (2—3 л). Воду меняют 3 раза в день. Спустя 3—4 дня агар заливают дистиллированной водой (2 л) и продолжают менять ее, по 3 раза в день, еще в течение 4—5 дней. Только после этого агар-агар можно считать относительно чистым. Однако закладывать опыты на таком агаре с микроэлементами или с ничтожными количествами стимуляторов роста не следует. Для этих целей надо использовать агар типа «Дифко».

Приготовление питательной среды. Технология приготовления питательных сред для культивирования *in vitro* из отдельных соединений довольно проста. Большинство сред готовят по следующей схеме:

1. Заранее готовят исходные концентрированные растворы солей.
2. Для приготовления определенного количества питательной среды в

стеклянную емкость, содержащую небольшой объем бидистиллированной воды, переносят необходимый объем каждого исходного раствора.

3. Последовательно добавляют сухие компоненты, полностью растворив предыдущие, приливая при необходимости немного бидистиллированной воды, соединения содержащие железо вносятся последними!

4. Доводят бидистиллированной водой объем питательной среды до 95%.

5. С помощью 5М раствора NaOH или 1М раствора HCl устанавливают pH до необходимого значения.

6. Питательную среду переносят в мерный цилиндр или колбу, необходимый объем достигается устанавливая бидистиллированной водой.

7. Отвешенный агар-агар прибавляют в разогреваемую питательную среду, перенесённую в термостойкую колбу или стакан. Агар растворяют при постоянном перемешивании, не доводя до кипения. После растворения агара, с целью осветления и получения гомогенного раствора, среду в горячем состоянии фильтруют через 2-3-хслойный марлевый фильтр.

8. Питательную среду равными порциями разливают в чистые пробирки или конические колбы, закупоривают ватными пробками, накрывая сверху алюминиевой фольгой или целлофаном.

9. Автоклавируют 20 мин при давлении 0,95 атм. или 30 мин при давлении 0,5 атм.

Проавтоклавированную охлажденную питательную среду рекомендуется использовать сразу, но не позже чем через 24 часа с момента автоклавирования. Температура хранения среды должна быть +4°C.

1.3. Практика микрклонального размножения и оздоровления растений

При микрклональном размножении и оздоровлении растений необходимо 1) соблюдать условия введения эксплантов в культуру *in vitro*; 2) создавать эффективные условия культивирования; 3) подготавливать

растения к переводу их из стерильных условий культивирования в открытый грунт.

В нашем практикуме биотехнологический процесс культивирования растений *in vitro* рассмотрен на примере некоторых методов получения растительного материала и представлен в виде лабораторных занятий.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 1

Получение безвирусных растений с помощью культуры апикальных меристем побега

При использовании данного метода культивируются очень маленькие фрагменты верхушки побега (0,3-0,5 мм) состоящие из апикальных меристем и 1-го – 3-х листовых примордиев. Существует определенная зависимость между размером верхушки и ее инфицированности: чем меньше размер культивируемой верхушки, тем выше шансы восстановить растение, свободное от вирусов, хотя при этом скорость роста и жизнеспособность экспланта заметно снижается.

Цель занятия. Освоить способ выделения и трансплантирования в условиях *in vitro* неинфицированных растущих апексов.

Реактивы и оборудование. Стерильная бидистиллированная вода в колбах от 0,5 до 1,0 л, проавтоклавированные 10–миллилитровые пробирки с 6 мл агаризованной (0,7%) питательной среды, микроскоп бинокулярный типа МБС, глазной скальпель, две препаровальные иголки (одна из которых отточена в виде ланцета, а другая оттянута на конус), пинцет, банки для слива воды 0,5-1,0 л, спиртовка, спички, 2 мерных стаканчика для стерилизации в этаноле инструмента и семян на 50 мл.

Объект исследования. Проклюнувшиеся семена или проросшие одно-двух суточные проростки пшеницы или других злаков служат объектами исследования.

Ход работы. Работа состоит из двух этапов (А, Б).

А. Стерилизация семян для культивирования.

Успех проведения экспериментов с изолированными частями растений в культуре *in vitro* прежде всего зависит от умения подобрать такие условия стерилизации растительного материала, которые с одной стороны позволяли бы получать неинфицированный материал, с другой - сохранить его в функционально активном состоянии. Растительный материал можно подготовить одним из двух способов, разработанных сотрудниками кафедры микробиологии и физиологии растений Б.Г. Быховцевым и В.А. Спиваком.

I. Способ получения изолированных апексов из проростков семян.

Способ включает следующие операции:

- 1) стерилизацию сухих зерновок 96% этанолом, 30-45 секунд;
- 2) промывку проточной дистиллированной водой до исчезновения запаха этанола;
- 3) выдерживание семян в растворе тетрациклина (30 мг/л), в течение 30 мин;
- 4) трехкратную промывку дистиллированной водой;
- 5) обработку семян раствором диацида (1:1000) в стерильных условиях - 5 мин;
- 6) пятикратная промывка автоклавированной дистиллированной водой.

Семена, обработанные таким образом, переносят в стерильные чашки Петри на фильтровальную бумагу, сюда же приливают 8-9 мл автоклавированной дистиллированной воды и оставляют на 2-е суток для проращивания в термощкафе, при температуре $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. По истечении 2-х суток, из проростков одинакового размера, выделяют апексы.

II. Способ ускоренного получения изолированных апексов из зрелых зерновок. Извлечение верхушечных почек из сухих зерновок (например, пшеницы) сложная и практически невыполнимая задача, поэтому замачивание семян является непременным условием успешного проведения операции вычленения главной почки. Однако, в природе процесс набухания

семян протекает асинхронно и зависит от большого числа факторов, и прежде всего индивидуального состояния объекта.

С целью устранения асинхронности при прорастании семян мы разработали способ ускоренного выделения верхушечных почек из зародышей зрелых зерновок. Включающий помимо ранее перечисленных операций, используемых при стерилизации материала вакуум-инфльтрация семян, следующую за промывкой объектов от диацита. Отмытые семена, помещённые в бюкс со стерильной водой и переносили под вакуум-эксикатор, сохраняя семена в асептических условиях, после чего откачивали воздух в течение 20-25 минут. Одновременно с удалением воздуха из эксикатора удаляется воздух из зародышей зерновок. В результате последующего выравнивания атмосферного давления в эксикаторе с внешней средой происходило принудительное заполнение воздушных полостей зерновки водой. До момента начала выделения апексов из зерновок их оставляют в бюксе с водой на 2,5-3 часа.

Б. Выделение апекса побега для культивирования *in vitro*.

Выделение структур главной почки проводят в стерильных условиях (микробиологических боксах, или ламинарах), при помощи бинокулярного стереоскопического микроскопа.

В том случае, если объектом препарирования служат проростки, первоначально с помощью скальпеля на предметном столике микроскопа выделяют 2–3-миллиметровую зону предполагаемого места нахождения верхушечной почки. Затем под микроскопом, манипулируя стерильными препаровальными иглами (придерживая конусной иглой объект, отрезая и удаляя фрагменты зерновки ланцетной) выделяют апекс с необходимым числом листовых примордиев. Подготовленный таким образом к трансплантации объект переносят на питательную среду с помощью конусной иглы (технику переноса объекта см. ниже).

Семена подвергавшиеся вакуумной инфльтрации, через 2,5–3 ч с

момента начала их стерилизации, в результате гидратирования тканей зародыша легко извлекаются из семяпочки под микроскопом с помощью двух игл (ланцетной и конусной). Стерильными иглами из зерновки выделяется главная почка, после чего идет раскрытие и удаление колеоптиля. В зависимости от цели опыта, можно удалить до 3-х листовых зачатков в апексе, вплоть до выделения исключительно конуса нарастания или апекса с прилегающим к нему листовым бугорком. Изолированные таким образом объекты, очень осторожно, на кончике заостренной на конус иглы, переносятся в пробирку с питательной средой. При этом необходимо следить за состоянием апекса. Если он был подсушен, то его не удастся взять иглой или может произойти его сброс с иглы. Поэтому необходимо весь процесс выделения и переноса апекса осуществлять за 30-60 секунд.

Не подсушенный изолированный трансплантат легко прилипает к поверхности кончика иглы, поэтому в момент взятия объекта необходимо сориентировать его положение и в таком виде перенести на поверхность среды. Агаризованная среда обладает большой силой сцепления и трансплантат при соприкосновении с ней оказывается более прочно прилипшим к поверхности. Заглубление экспланта в питательную среду не допускается! Погружённый в среду объект погибает. Этого можно избежать если при переносе апекса на среду внимательно следить за совмещением кончика иглы с её отражением на агаризованной поверхности. В момент совмещения необходимо прекратить поступательное движение иглой, чтобы не произошло механическое погружение апекса в среду.

Высаженные апексы культивируют в термошкафе при $t=25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Визуально наблюдаемые изменения с эксплантом происходят через 3-5 дней.

Оформление результатов. Опишите все сделанные операции, проведите оценку состояния эксплантов, указав на изменения произошедшие в период культивирования. Зарисуйте внешний вид эксплантов до и после культивирования.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 2

Получение каллусов из стеблевой части ценных видов, пород и сортов растений

В настоящее время существует насущная потребность в размножении многих видов ценных в хозяйственном отношении, редких и исчезающих видов и сортов растений имеющих низкий коэффициент размножения в естественных условиях. С помощью каллусной культуры ткани можно не только решить проблему сохранения ценных растений, но и получать растения с новыми ценными признаками, т.е. вести селекцию растений.

Каллусная ткань возникает первоначально в местах поранения растения и является ранозаживляющей интегрированной структурой имеющая собственную организацию. Составляющие её клетки обладают уникальной органогенной способностью, в недифференцированном состоянии могут оставаться длительное время, сохраняя при этом все наследственные признаки материнского организма, образуют клетки с различной ploидностью.

Каллусы можно получить практически из любых живых клеточных структур. Наиболее активно каллус образуется следующими меристемами и клеточными структурами: камбием, феллогеном, сердцевинной паренхимой, клетками перимедулярной зоны и др.

Цель работы. Научиться работать с исходными объектами объектами, выделять экспланты и получать активно растущую каллусную ткань.

Реактивы и оборудование. Стерильная бидистиллированная вода в колбах от 0,5 до 1,0 л, проавтоклавированные пробирки с 6-ю мл агаризованной (0,7%) питательной средой, скальпель, пинцет, банки для слива воды 0,5-1,0 л, спиртовка, спички, 100-150 мл этанола 96%, склянка с этанолом для стерилизации инструмента на 50-100 мл.

Объект исследования. Объектом исследования служат междоузлия побега, сердцевинная паренхима стебля травянистых растений, сочные

чешуи луковицы и др. Удобнее проводить работу со стеблевыми черенками тополя, ивы, сердцевинной паренхимой табака, луковичками гиацинтов.

Ход работы. Работа состоит из следующих этапов.

I. Подготовка и поверхностная стерилизация стебля древесного растения.

1) На однолетнем побеге удаляются листья и почки, стебель тщательно обрабатывается щелочным мылом или стиральным порошком и промывается в проточной воде до исчезновения ощущения скольжения пальцев по стеблю.

2) Междоузлия стебля, разрезанные на сегменты длиной 4-6 см, связывают пучками по 10–12 штук и в асептических условиях помещают на 20 мин в 4% раствор формалина, с последующей пятикратной промывкой стерильной дистиллированной водой.

II. Выделение фрагмента для трансплантации. Скальпелем, на стерильной бумаге в ламинаре или боксе, выделяют фрагменты длиной не более 1 см, имеющие с апикальной стороны, поперечно перпендикулярной оси стебля, срез, а с базальной - скошенный под углом в 30° . Плоскостью среза с апикальной стороны фрагмент помещается на агаризованную среду с помощью пинцета.

III. Инкубация трансплантата. Эксплант инкубируют в темноте на агаризованной питательной среде при $t=25^{\circ}\text{C}$ в течение трех недель.

Оформление результатов. Опишите все проделанные операции, проведите оценку состояния экспланта и каллуса, до и после культивирования. Зарисуйте их.

Система оценки скорости роста каллуса. Предлагаемая система оценки скорости роста каллуса является важным показателем эффективности условий культивирования и может проводиться по следующей шкале:

0 - инфицирован микроорганизмами, нет роста;

1 - очень слабый фрагментарный рост в камбиальной или

перимедулярной зонах;

2 - слабый рост по камбиальному кольцу или перимедулярной зоне;

3 - умеренный рост каллуса;

4 - интенсивный рост каллуса по всей поверхности среза;

5 - каллус активно разрастается, разрывая покровную ткань стебля.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 3

Культивирование первичного каллуса на агаризованной питательной среде

Первичный активно растущий каллус, образовавшийся на экспланте культивируемом в асептических условиях и не имеющий некротизированных участков, по достижению размеров, позволяющих его легко отделить, можно перенести на свежую питательную среду. Последующие регулярные пересадки дают возможность длительное время сохранять каллусную ткань в состоянии непрерывного роста.

Пассируемая каллусная ткань может быть использована в качестве донорной для получения изолированных клеток, каллусной ткани продуцирующей ценные биохимические вещества для легкой промышленности и фармацевтии. При изменении условий культивирования из таких каллусов, индуцируя в них морфогенетические процессы, приводящие к образованию эмбриогенных структур, можно получить целые растения.

Цель занятия. Освоить метод изолирования и пассирования активно растущей каллусной ткани.

Реактивы и оборудование. Проавтоклавированные пробирки с агаризованной (0,7%) питательной средой, 100-150 мл этанола 96%, скальпели, пинцеты, шпатель, спиртовка, вата для протирки этанолом рук и препаровального столика, спички, склянка с этанолом для стерилизации

инструмента на 50-100 мл.

Объект исследования. Объектом исследования служат асептические каллусы, образовавшиеся на культивируемых в условиях *in vitro* междоузлиях побега, сердцевине паренхимы стебля травянистых растений, сочных чешуях луковиц и др.

Ход работы. Работа состоит из двух этапов:

I. *Отделение каллуса от экспланта донора.* В стерильных условиях эксплант содержащий каллусную ткань, перенесется из культивационной посуды на простерилизованный препаративный столик. С экспланта, удерживаемого пинцетом экспланта стерильным скальпелем срезать каллус или его активно растущий фрагмент. Если каллусная ткань имеет большой размер, то ее разрезать на фрагменты. Для тополя минимальный размер каллуса, обеспечивающий удовлетворительный рост, $2 \times 2 \times 3$ мм.

II. *Перенос каллуса на новую питательную среду.* Над спиртовкой открывают пробирку или колбу, в которую планируется перенести каллусную ткань, и удерживая в одной руке, так чтобы горлышко было перед пламенем спиртовки, в другую берут стерильный шпатель, которым захватывается один из фрагментов каллусной ткани и переносится в данную посуду, горлышко при этом на короткое время выводится из пламени. Каллусную ткань желательно поместить местом среза на поверхность среды. После чего посуда с трансплантантом должна быть сразу закупорена ватной пробкой над пламенем спиртовки.

Высаженные апексы культивируют в термошкафе при $t=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Видимые изменения с эксплантом отмечают уже через 3–5 дней.

Оформление результатов. Опишите все проделанные операции. Зарисуйте внешний вид каллусной ткани до начала и после окончания культивирования. Проведите оценку состояния каллусов, указав на изменения, произошедшие в период культивирования.

Система оценки скорости роста каллуса. Предлагаемая система

оценки скорости роста каллуса используется для выявления физиологического состояния и перспективности дальнейшего эксплантирования каллуса и может проводится по следующей шкале:

- 0 - инфицирован микроорганизмами, нет роста;
- 1 - очень слабый рост;
- 2 - фрагментарный рост;
- 3 - умеренный рост каллуса;
- 4 - интенсивный рост каллуса;
- 5 - каллус активно разрастается;
- 6 – в каллусе образуются морфогенные структуры (локусы, корни и т.д.).

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №4

Регенерация растений из первичных эксплантов путем прямого органогенеза (на примере *Begonia*)

Данный метод регенерации растений (Биотехнология растений, 1989) особенно пригоден для травянистых растений при использовании листьев, луковиц, клубнелуковиц, стеблей, корневищ и клубней. Эксплант помещают на питательную среду, содержащую небольшие количества ауксинов и цитокининов (чтобы избежать формирования каллуса), после чего из него образуются побеги. Размножение осуществляется путем расщепления пучка побегов и высаживания отдельных побегов в сосуды. Этот метод нельзя использовать для клонирования неоднородных (химерных) растений, поскольку образовавшиеся в результате растения-потомки или будут изменены, или полностью утратят неоднородность.

Цель занятия. Научиться получать растения путём прямого органогенеза из культивируемых эксплантов.

Реактивы и оборудование. Промывочные колбы (50 мл) с

агаризованной (0,7%) питательной средой по Мурасиге и Скугу, 100-150 мл этанола 96%, скальпели, пинцеты, шпатель, спиртовка, вата для протирки этанолом рук и препаровального столика, спички, склянка с этанолом для стерилизации инструмента на 100 мл.

Объект исследования. Объектом исследования служат молодые листья растений выращенные *in situ*.

Ход работы.

1. Срезают молодые, полностью развернувшиеся листья с черешками на растении *Begonia*, желательном, выращенном в теплице.

2. Дезинфицируют их, обработав 5,25% раствором гипохлорита натрия, содержащего 0,5% Твин-20, в течение 10 мин. Ополаскивают трижды в стерильной дистиллированной воде.

3. Разрезают листья на кусочки длиной 5 мм и помещают их адаксиальной стороной на поверхность агаризованной среды, содержащей 1,8 мкМ БАП и 0,54 мкМ НУК.

4. Инкубируют при 25—29°C на 16-часовом световом дне и освещенности 1000 лк. Придаточные побеги образуются прямо из экспланта через 4 недели.

5. Деление эксплантов и перенос их на ту же среду осуществляется через каждые 4 недели. Эту процедуру продолжают до получения необходимого числа растений.

6. Побеги укореняют, перенеся их на ту же агаризованную среду, но содержащую из физиологически активных веществ лишь 0,54 мкМ НУК.

Оформление результатов. Опишите все сделанные операции. Зарисуйте внешний вид эксплантов до начала и после окончания культивирования. Проведите оценку органогенной активности тканей листа, указав на изменения, произошедшие в период культивирования.

Система оценки скорости роста каллуса. Предлагаемая система оценки скорости органогенных реакций может быть использована для выявления физиологического состояния экспланта и перспективности культивирования

и может проводиться по следующей шкале:

- 0 - инфицирован микроорганизмами, нет роста;
- 1 - очень низкая органогенная способность тканей, единичные эмбриониды;
- 2 - растёт каллус;
- 3 – в каллусе образуются морфогенные структуры (локусы, корни и т.д.);
- 4 - фрагментарный органогенез;
- 5 - фрагментарный органогенез с большим количеством эмбриогенных структур в фрагментах;
- 6 - интенсивный органогенез по всей поверхности среза.

II. МЕТОДЫ ТЕХНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

2.1. Принципы отбора штаммов-продуцентов.

Понятие о первичных и вторичных метаболитах

Одна из важнейших задач современной промышленной микробиологии состоит в разработке методов получения новых продуктов. Идеальный микробный скрининг должен быть *специфичным* - открывать только желаемые эффекты, *точным* - давать определенный ответ: да или нет, *чувствительным* - открывать до 25 мкг/мл вещества или меньше, *надежным* - проявлять стабильность в условиях сложной микробной культуральной жидкости, *автоматическим* — позволять осуществлять скрининг до 100 тыс микробных культур. Такие условия возможны в новых программах, построенных на методах, учитывающих механизмы биохимических реакций (иммунологические определения, использование ингибиторов ферментов, связывание с меченым лигандом и др.).

Стратегия селекционной работы с микроорганизмами заключается в поиске природных форм, которые обладают какими-либо полезными для человека свойствами (синтез ценного соединения, высокая скорость роста, способность к усвоению дешевых и доступных субстратов и пр.), и в последующем их улучшении, создании на их основе промышленных

штаммов. Эта задача обычно решается путем изменения регуляции метаболической активности микробной клетки.

В метаболизме микроорганизмов различают первичные и вторичные метаболиты. Микробным метаболитом называют молекулу, которая участвует в метаболизме, и это может относиться к CO_2 , H_2 , N_2 , с одной стороны, или к DNA, белкам, белкам-ферментам - с другой.

Первичные метаболиты необходимы для роста и размножения клеток и сходны у всех микроорганизмов. Первичные продукты анаболизма, имеющие промышленную важность, это липиды, витамины, биомасса, полисахариды и интермедиаты клеточного биосинтеза: нуклеотиды и аминокислоты.

Первичные продукты катаболического обмена - это этанол, уксусная кислота, CO_2 , АТФ.

Вторичные метаболиты возникают после остановки роста микроба (иногда и раньше) и могут различаться у разных организмов. Образование вторичных метаболитов зависит от состава среды и условий роста, а регуляция их биосинтеза отличается от регуляции синтеза первичных метаболитов. У вторичных метаболитов обычно более сложная молекулярная организация, чем у первичных.

Из вторичных продуктов анаболического обмена наиболее важны антибиотики, алкалоиды, токсины. Вторичные продукты катаболизма, например, ацетон и бутанол,

Одна из главных задач промышленной микробиологии - увеличение выхода целевого продукта (клеточной массы, внутриклеточных или внеклеточных продуктов), точнее, увеличение выхода продукта по отношению к потребленному субстрату (субстратам). Выход продукта по отношению к использованному субстрату называют экономическим коэффициентом Y (Y - от английского слова yeald — выход, урожай). Чем выше Y , тем выше продуктивность биотехнологического процесса. При

низкой продуктивности производство оказывается нерентабельным и неконкурентноспособным.

Экономический коэффициент рассчитывают по источнику углерода, энергии, фосфора, азота, но наиболее важный стехиометрический показатель для большинства микробиологических производств - это экономический показатель по источнику углерода.

Под сверхсинтезом понимают такое производство продукта, которое не требуется для роста самого продуцента. Следовательно, эти продукты возникают при замедлении роста. Некоторые из них относят ко вторичным метаболитам.

2.2. Наиболее перспективные для промышленности микробные экзополисахариды

Одним из перспективных направлений в современной микробной биотехнологии является получение микробных экзополисахаридов, имеющих огромное прикладное значение.

В настоящее время микробные экзогликаны находят все более широкое применение в различных сферах деятельности человека: нефте- и горнодобывающей, текстильной, пищевой, фармацевтической, химической промышленности и медицине. Потребность в этих биополимерах постоянно растет. Так, если в 1984 году сумма от их продажи составляла 200 млн. долларов, то к 1992 году она составила 476,9 млн. долларов. Однако спрос на эти биополимеры удовлетворяется не полно.

Наиболее перспективными для использования в пищевой промышленности в США, Европе и Японии считаются следующие микробные полисахариды: ксантан (продуцент *X. campestris*), геллан (продуцент *P. elodea*), склероглюкан (продуцент *Sclerotium* sp.), курдлан (*A. faecalis*, *Agrobacterium*), бактериальный альгинат (*A. vinelandii*) и другие.

Кислые экзополисахариды

Ксантан - гетерополисахарид, продуцируемый фитопатогенной бактерией *X. campestris*. Широкое применение ксантана обусловлено его уникальными физикохимическими свойствами в водных растворах. Прежде всего, это выраженное свойство суспендирования твердых частиц и стабилизации эмульсий, проявляющееся уже при низких концентрациях (0,1-1 %); свойство псевдопластичности; незначительное изменение вязкости при повышении температуры (до 60-80 °С); гелеобразование при взаимодействии с рядом растительных галактоманнанов (синергизм).

Ксантан в последнее время является наиболее широко производимым в мире микробным полисахаридом. Этот полисахарид нашел применение во всех отраслях, где используются полимеры-загустители, стабилизаторы, суспендаторы, и успешно вытесняет из этих сфер растительные полисахариды.

Основное свойство ксантана - способность формировать высоковязкие растворы даже с низкой концентрацией полимера в состоянии покоя и при малых концентрациях. Многие полисахариды заметно меняют вязкость при изменении pH. Однако в присутствии небольших количеств соли (0,1 %) вязкость раствора ксантана не меняется в интервале значений pH 1-11 и он может сохранять свою упорядоченную структуру до 100°C. Растворы ксантана устойчивы к тепловой обработке, они могут выдерживаться при повышенной температуре в течение длительного времени без существенного изменения вязкости.

Полисахарид S-10 (торговое название **Zanflo**) продуцируется почвенными бактериями, выделенными из образцов почвы о. Таити и определенными сначала как *Erwinia tahitica*. В результате дальнейших исследований продуцент был отнесен к виду *Klebsiella pneumoniae*.

Этот полисахарид обладает высокой вязкостью и псевдопластичностью. В отличие от растворов ксантана, но как большинство

полисахаридов, S-10 образует растворы, в которых обратимо снижается вязкость при повышении температуры. Растворы S-10 стабильны в интервале рН от 5 до 11 и хорошо совместимы с солями высоких концентраций. Несмотря на то, что S-10 - кислый полисахарид, он отлично устойчив при добавках катионных красителей и других агентов, а также к действию целлюлаз и многих других распространенных ферментов. S-10 имеет высокие суспендирующие и хорошие смазочные свойства, эффективен при стабилизации эмульсий. Предложено применение S-10 в лакокрасочной промышленности и при производстве текстиля.

Исследователи из фирмы «Келко» получили несколько прогрессивных продуцентов *экзополисахаридов*, принадлежащих к виду *Klebsiella pneumoniae*. Наиболее интересны из них, с практической точки зрения, **полисахарид S-21**, который продуцируется мутантным штаммом АТСС 31314, полученным из культуры, выделенной из ризосферы эхмеи (растения семейства бромелиевых), росшей в зоне Панамского канала. Этот ЭПС нестабилен в кислотах, щелочах и при температуре $> 120^{\circ}\text{C}$. При низких концентрациях (0,5 %) S-21 демонстрирует высокую вязкость, во много раз превосходящую таковую растворов ксантана равных концентраций, причем как в пресной воде, так и в солевых растворах. Кроме того, растворы S-21 высоко псевдопластичны и тиксотропны. S-21 предлагается использовать для приготовления полимерцементных растворов, клеев, в составах, где в настоящее время используют гидроксиэтилцеллюлозу.

Полисахарид S-53 продуцируется штаммом А ТСС 31488, выделенным из ризосферы *Gotianta lupoloides*, растущей в зоне Панамского канала. ЭПС S-53 совместим со многими одно-, двух- и трехвалентными катионами, стабилен в интервале значений рН 3-11, но не выдерживает прогрева, не образует гели. Предполагается использовать S-53 для стабилизации эмульсий и суспензий, в полиграфии, текстильной и нефтедобывающей промышленности.

Экзополисахарид S-156, продуцируемый штаммом А тсс 31646, выделенным из образца почвы штата Нью-Йорк. Этот полимер совместим с катионными красителями, с солями одно- и двухвалентных металлов. Вязкость растворов S-156 не изменяется при значениях рН 1-11. Препарат используется в составе латексов.

В литературе описаны еще несколько кислых ЭПС клебсиелл, полученных в Японии и Германии, а также нейтральные ЭПС клебсиелл. Предполагаемые сферы применения этих экзогликанов - текстильная, пищевая и химическая отрасли промышленности. Кроме того, полисахариды клебсиелл нашли применение в медицине как иммуномодуляторы, в качестве нежировых основ мазей, кремов, аэрозолей и для диагностических целей.

Полисахарид PS-7, синтезируемый почвенными бактериями *Beijerinckia indica var. tuxogenes*, производится отделением «Келко» фирмы «Мерк и К^о». PS-7 хорошо растворим в соленой, морской и пресной воде, как холодной, так и горячей. Растворы полисахарида совместимы с высокими концентрациями солей (вплоть до 26 % хлористого натрия и 32 % хлористого кальция). В присутствии солей вязкость растворов несколько повышается. В щелочной среде в присутствии поливалентных катионов растворы PS-7 переходят в гель, подобное явление наблюдается и в присутствии одновалентных катионов при рН около 10. Этот полисахарид дает псевдопластические растворы очень высокой вязкости (примерно в два раза более вязкие, чем растворы такой же концентрации ксантана). Вязкость раствора, подобно растворам ксантана, практически не изменяется в диапазоне температур от 0 до 90 °С и рН от 3 до 12.

Потенциальные сферы применения полисахарида PS-7 включают буровые работы, производство не капающих красок, клеев и многие другие области, где нужны хорошие суспендирующие свойства, совместимость со многими солями и способность образовывать поперечные сшивки

трехвалентным хромом.

Индикан - ЭПС *Beijerinckia indica* хорошо сочетается с другими водорастворимыми полимерами, такими как КМЦ, ксантан, альгинат и т.д. Индикан используется для приготовления быстрорастворимых суспензий этих полимеров. Он растворим в метаноле, этиленгликоле и смеси 1: 1 метанолметилхлорид (до 1 %), давая вязкие растворы, что позволяет с его помощью регулировать вязкость не только водных, но и содержащих эти растворители систем. Растворы индикана псевдопластичны и тиксотропны.

Индикан обладает хорошими загущающими, суспендирующими, эмульгирующими и стабилизирующими свойствами в водных и спиртосодержащих растворах. При испарении растворителя из тонкого слоя индикан образует гибкие пленки. Используется этот ЭПС в пищевой промышленности для образования желе в мясных консервах; для приготовления буровых растворов; при изготовлении некапающих красок, латексов, стеновых цементов, для заводнения пластов при вторичной добыче нефти и т. д.

Бактериальный альгинат. Гликоуронан - альгиновая кислота - хорошо известный и коммерчески важный ингредиент бурых водорослей. Установлено, что сходный полисахарид экскретируют в среду бактерии видов *P. aeruginosa*, а также другие виды псевдомонад, несвязанные с инфекционными процессами у человека. Подобный полисахарид продуцирует также *A. vinelandii*, однако пути биосинтеза у псевдомонад и азотобактера различны. Бактериальный альгинат очень схож с альгинатом, получаемым из водорослей, по составу, химическим и физическим свойствам, наличием в структуре вкраплений остатков сахаров.

Для получения и использования альгинатов важным является то, что соли щелочных металлов альгиновой кислоты растворимы в воде, и их растворы обладают высокой вязкостью при низких концентрациях альгината. Добавление двухвалентных катионов, таких, как кальций, магний,

приводит к застудневанию (гелеобразованию), причем качеством геля можно управлять, изменяя концентрацию соли. Благодаря своим уникальным свойствам, альгинат может быть использован в пищевой, фармацевтической, химической промышленности, сельском хозяйстве, изготовлении текстиля и бумаги, в качестве стабилизатора суспензий и эмульсий на водной основе, загустителя и пленкообразователя.

Геллан - кислый полисахарид, продуцируемый микроорганизмом *P. Elodea* А ТСС 31461. При нагревании водных растворов геллана образуется термообратимый гель. Геллан производится отделением «Келко» фирмы «Мерк и К^о» под маркой **S-60** в трех формах: нативный, деацетилованный нативный и деацетилованный очищенный. Деацетилованные формы геллана образуют хрупкий гель в присутствии катионов, причем прочность геля обуславливается концентрацией полисахарида и соли в геле, а также в виде катиона. Гель деацетилованного геллана застывает при температуре 30-50⁰С, а разжижается при температуре 90⁰С. Геллан хорошо растворим в холодной воде, устойчив к ферментативной деградации.

Геллан используется в качестве загустителя питательных сред для культур клеток и тканей, а также в микробиологии. Имеется большой потенциал использования геллана в пищевой промышленности.

Сходную с гелланом структуру имеет ЭПС **S-88**, синтезируемый *Pseudomonas* sp. А ТСС 31554.

Полисахариды псевдомонад дают высокую вязкость растворов в различных условиях, хорошую совместимость с солями, великолепную стабильность свойств растворов при повышенных температурах, действию ферментов, в широком диапазоне рН среды. Эти биополимеры рекомендуется применять в качестве загустителей, суспендаторов и стабилизаторов водных систем уже в низких концентрациях. Кроме того, эти гетерополисахариды обладают хорошими смазывающими и

пленкообразующими свойствами. В связи с этим потенциал применения полисахаридов псевдомонад охватывает широкие сферы от приготовления буровых растворов, чистящих, абразивных и полирующих составов до пищевой промышленности и косметики.

Из внеклеточных кислых *гетерополисахаридов*, которые продуцируются различными штаммами водных грамотрицательных бактерий рода *Alcaligenes*, имеют практическое значение *S-130 (велан)*, *S-194 (рамзан)* и *S-198*, производимые отделением «Келко» фирмы «Мерк и К⁰» (США). Благодаря своим высоким реологическим свойствам, значительно превосходящим ксантан, отличной совместимости с солями и красителями высоких концентраций, термостойкости, эти полисахариды могут быть с успехом применены в сельском хозяйстве для приготовления препаратов удобрений и пестицидов, для создания смазочных и буровых растворов, красок и клеев, в пищевой и текстильной промышленности.

Нейтральные полисахариды

Склероглюкан - нейтральный капсульный полисахарид, секретлируемый некоторыми видами мицелиальных несовершенных грибов, принадлежащих к родам *Helotium*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Corticium* и *Stromatinia*.

Растворы склероглюкана обладают высокой вязкостью и псевдопластичностью. Важно, что вязкость растворов этого полисахарида мало изменяется под действием неблагоприятных факторов. В щелочных растворах склероглюкан образует комплекс с боратами, формируя прочный гель. Склероглюкан может образовывать пленки, устойчивые к механическим воздействиям и воде, для этого их пропитывают глицерином, в результате чего из хрупкой пленка становится гибкой и прочной.

Склероглюкан с успехом используется в изготовлении фарфора и керамики. В качестве клеящего вещества, как загустителя для красок на

водной основе, при изготовлении бумаги и в полиграфии, при вторичной добыче нефти, как компонент буровых растворов, при изготовлении кормовых концентратов, как источник гентобиозы, многих других отраслях, в том числе фармацевтике, пищевой промышленности. Для технических целей полисахарид не очищают, а для пищевой, фармацевтической промышленности и косметики склероглюкан освобождают от биомассы продукта и очищают преципитацией, фильтрованием и т.п.

Разработаны методы получения производных склероглюкана, таких, как метил-, ацетил-, карбоксиметил-, бензил-, бензоат-, цианоэтил-, сульфат- и сульфоалкил-производных, что значительно расширяет возможности применения склероглюкана. Склероглюкан производится и продается фирмой «Пилсбери К^О» (США) под маркой «Политран» и французской компанией ЦЕСА под маркой «Биополимер ЦС».

В качестве продуцентов экзополисахаридов определенный интерес представляют микроорганизмы, утилизирующие неуглеводные источники углерода, в частности, низшие спирты. Ряд экзополисахаридов, синтезируемых такими бактериями, дают растворы высокой вязкости и проявляют способность к гелеобразованию.

К числу таких полисахаридов относится *эмульсан* - полисахарид, продуцируемый этанолутилизирующими бактериями рода *Acinetobacter*. Растворы эмульсана обладают более высокой, чем у ксантана, вязкостью, хорошей псевдопластичностью и устойчивостью ко многим неблагоприятным воздействиям. Эмульсан обладает уникальными для полисахаридов поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами. Эмульсан с успехом можно применять для третичной добычи нефти, удаления нефти из почв и горных пород, приготовления стойких суспензий и эмульсий гидрофобных веществ в воде и водных суспензий в гидрофобных жидкостях, изготовления красок, косметических и пищевых препаратов и т.п. не только в качестве эмульгатора, но и эффективного загустителя.

Для бактерий рода *Alcaligenes* характерна продукция кислых и нейтральных ЭПС. Нейтральные полисахариды представлены гелеобразующими полимерами курдланом и курдланоподобными ЭПС, а также сукциногликанами.

Курдлан при нагревании его водных растворов образует термически необратимый упругий гель. Перевести курдлан снова в растворимое состояние можно, повысив значение pH раствора до щелочного. Таким образом курдлан может быть легко выделен из раствора. Курдлановые гели более эластичны, чем агаровые, гораздо более устойчивы к замораживанию-оттаиванию. Курдлан дает специфическую окраску с анилиновым синим, и по этой реакции выявляют продуценты курдлана и курдланоподобные полисахариды.

Курдлан пригоден для использования в пищевой промышленности: для приготовления желе, как добавка при выпечке хлебопродуктов и для приготовления низкокалорийной пищи. Другое направление потенциального применения курдлана включает образование пленок, волокон и носителей для иммобилизации ферментов и клеток в биотехнологии. Курдлан можно использовать и как сырье для получения редких сахаров - гентобиозы и ламинарибиозы. Для фармацевтики важно, что курдлан обладает противоопухолевой активностью.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №5

Отбор штаммов – продуцентов экзополисахаридов, имеющих промышленное значение

Цель занятия. 1. Определить способность к продукции экзополисахарида выданных культур *Paenibacillus polymyxa*.

2. Выделить экзополисахарид из культуральной среды для биохимических исследований.

Реактивы и оборудование. Чашки Петри, пробирки, капустная среда,

полужидкий агар Мартена.

Объект исследования. Культура *Paenibacillus polymyxa*.

Ход работы. 1. Приготовить 2 чашки Петри с капустной средой для выращивания бацилл.

2. Провести посев выданных культур на сектора агаровой среды, инкубировать 24 – 48 ч при 28°C.

3. Отобрать колонии в М-форме (с характерным слизистым ростом), приготовить мазки и провести микроскопическое исследование культур.

4. Провести пересев отобранных культур на скошенный агар для накопления и в бульон для последующего выделения экзополисахарида.

5. Проверить чистоту выросшей культуры на скошенном агаре и с делать пересев на полужидкий агар Мартена для сохранения в музее культур.

6. Выделить экзополисахарид из бульонной культуры отобранного штамма для биохимических исследований.

2.3. Биотехнология получения первичных метаболитов.

Производство витаминов

Витамины представляют собой группу незаменимых органических соединений различной химической природы, необходимых любому организму в ничтожных концентрациях и выполняющих в нем каталитические и регуляторные функции. Недостаток того или иного витамина нарушает обмен веществ и нормальные процессы жизнедеятельности организма, приводя к развитию патологических состояний.

Известно, что многие микроорганизмы способны к синтезу целого ряда витаминов. Благодаря изучению физиологии и генетики микроорганизмов — продуцентов витаминов и выяснению путей биосинтеза каждого из них создана теоретическая основа для получения микробиологическим способом практически всех известных в настоящее время витаминов. Однако наиболее

востребованными оказались разработки технологий промышленного микробиологического производства лишь особо сложных по строению витаминов: B_2 , B_{12} , β -каротина (провитамин А) и предшественников витамина D. Остальные витамины либо выделяют из природных источников, либо синтезируют химическим путем.

Витамины — объекты международной торговли. Так, витамин B_{12} российского производства экспортируют в Польшу, Германию, Чехию, Словакию и другие страны. Витамины используются в качестве лечебных препаратов, для создания сбалансированных пищевых и кормовых рационов и для интенсификации биотехнологических процессов.

Получение витамина B_{12} (Cоa [α -(5,6-диметилбензимидазол)]- Cоb — цианокобамид). Витамин B_{12} открыт в 1948 г. одновременно в США и Англии. В 1972 г. в Гарвардском университете был осуществлен химический синтез корриноидного предшественника витамина B_{12} . Химический синтез корнестерона — структурного элемента корринового кольца витамина, включающий 37 стадий, в крупных масштабах не воспроизведен из-за сложности процесса.

Витамин B_{12} регулирует углеводный и липидный обмен, участвует в метаболизме незаменимых аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стимулирует образование предшественников гемоглобина в костном мозге, применяется в медицине для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени, полиневрита и т. п. Добавление витамина к кормам способствует более полноценному усвоению растительных белков и повышает продуктивность сельскохозяйственных животных на 10—15 %.

Первоначально витамин B_{12} получали исключительно из природного сырья, но из 1 т печени можно было выделить всего лишь 15 мг витамина. Единственный способ его получения в настоящее время —

микробиологический синтез. Механизмы регуляции биосинтеза витамина В₁₂ до настоящего времени полностью не расшифрованы. Известно, что при высоких концентрациях витамин полностью репрессирует синтез ключевых ферментов своего новообразования.

Продуцентами витамина В₁₂ при его промышленном получении служат актиномицеты, метанообразующие и фотосинтезирующие бактерии, одноклеточные водоросли. В 70-х годах XX в. интерес ученых привлекли пропионовокислые бактерии, было выделено 14 видов этих бактерий, продуцирующих витамин В₁₂ (Л. И. Воробьевой дана физиолого-биохимическая характеристика этих бактерий).

Для получения высокоочищенных препаратов витамина В₁₂ пропионовокислые бактерии культивируют периодическим способом на средах, содержащих глюкозу, казеиновый гидролизат, витамины, неорганические соли, хлорид кобальта. Так, выход витамина на среде с кукурузным экстрактом и глюкозой при поддержании стабильного значения рН близ нейтральных зон достигает 21 — 23 мг/л. Мутант пропионовокислых бактерий продуцирует до 30 мг/л витамина. Бактерии плохо переносят перемешивание. Применение уплотняющих агентов (агар, крахмал), предотвращающих оседание бактерий, а также использование высокоанаэробных условий и автоматического поддержания рН позволяет получить наиболее высокий выход витамина — 58 мг/л.

Из культуральной жидкости витамин В₁₂ выделяют экстракцией органическими растворителями, ионообменной хроматографией с последующим осаждением из фракций в виде труднорастворимых соединений. В процессе получения витамина В₁₂ с помощью пропионовокислых бактерий применяют дорогостоящую антикоррозийную аппаратуру, сложные и дорогие питательные среды. Усовершенствование технологического процесса идет в направлении удешевления компонентов питательных сред (замена глюкозы сульфитными щелочами) и перехода с

периодического культивирования на непрерывный процесс. В последние годы исследуется возможность получения витамина с использованием иммобилизованных клеток пропионовокислых бактерий.

Для нужд животноводства сотрудниками Института биохимии им. А. Н. Баха РАН разработана более простая и дешевая технология получения витамина V_{12} , при культивировании комплекса термофильных микроорганизмов, производящих метановое брожение (целлюлозо-разлагающие, углеводсбраживающие, аммонифицирующие, сульфит-восстанавливающие и метанообразующие бактерии). Этот процесс промышленного получения витамина V_{12} — пример безотходной и экологически чистой технологии. Сырьем для ее реализации служат массовые отходы, а конечными продуктами — биогаз (65 % метана, 30 % диоксида углерода), использующийся как топливо, и биомасса метановых бактерий — источник биологически активных соединений, активирующих, например, рост молочнокислых бактерий.

В коллекции культур микроорганизмов кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета имеются штаммы азотобактера, способные к синтезу витамина V_{12} , которые используются при проведении практических занятий по биотехнологии.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 6

Изучение биосинтеза витамина V_{12} азотобактером

Цель занятия. 1. Определить способность азотобактера к образованию витамина V_{12} , используя в качестве тест-объекта чувствительную к витамину культуру *E.coli* штамм 113-3 (из коллекции Фридерика музея культур кафедры).

2. Оценить количественно содержание цианкобаламина в фильтрате бульонной культуры азотобактера по калибровочной шкале.

Реактивы и оборудование. Пипетки, пробирки, бактериальные фильтры,

ФЭК, термостат.

Объект исследования. Культура азотобактера.

Ход работы. 1. Приготовить среду следующего состава: K_2HPO_4 - 7 г, KH_2PO_4 - 3 г, Na лимоннокислый - 0,5 г, $MgSO_4$ - 0,1 г, $(NH_4)_2SO_4$ - 1 г, глюкоза - 2 г, NaCl - 0,5 г, KCN - 0,001 г (5 мл р-ра концентрации 0,2 мг/мл), H_2O - 1 л. Разлить среду в пробирки одинакового размера: по 4 пробирки, содержащие среду в объеме 10 мл, 9,5 мл, 9 мл, 8,5 мл и 8 мл. Все пробирки простерилизовать при 0,5 атм 20 минут.

2. Приготовить раствор витамина B_{12} из расчета 0,0005 мкг/мл.

3. Приготовить фильтрат исследуемой бульонной культуры азотобактера (фильтр после использования промыть и подготовить к стерилизации).

4. Для построения калибровочной кривой взять по 3 пробирки каждого объема среды и внести в них раствор витамина (кроме пробирок с 10 мл среды) в количестве 0,5 мл, 1 мл, 1,5 мл и 2 мл соответственно. Исследуемый фильтрат добавить в соответствующие опытные пробирки в таких же количествах.

5. Приготовить взвесь тест-культуры *E.coli* 113-3, содержащей 300000 микробных клеток в мл. Во все пробирки засеять по 1 капле (0,05 мл) взвеси культуры. Посевы поместить в термостат на 37^0 С на 24 - 48 часов.

6. С помощью ФЭК определить степень мутности в опытных и калибровочных пробирках. Построить калибровочную кривую и с ее помощью определить содержание витамина B_{12} в исследуемом фильтрате бульонной культуры азотобактера.

2.4. Биотехнология получения вторичных метаболитов

Получение антибиотиков

Принципы получения вторичных метаболитов основаны на особенностях их образования клетками микроорганизмов. Биосинтез вторичных метаболитов фазоспецифичен и происходит по завершении стадии роста, в идиофазе,

благодаря чему их еще называют идиолитами. Среди вторичных метаболитов ведущее место по объему производства занимают антибиотики.

В мире ежегодно производится антибиотиков почти на 20 млрд долларов. К числу антибиотиков относятся важнейшие противомикробные и противоопухолевые препараты. Открытие антибиотиков произвело переворот в лечении инфекционных заболеваний. Ушли в прошлое представления о неизлечимости многих бактериальных инфекций (туберкулез, сепсис, сифилис и др.). Антибиотики помимо медицины более широко используются в растениеводстве, животноводстве, ветеринарии, пищевой промышленности. Организация крупномасштабного производства антибиотиков сыграла решающую роль в становлении промышленной биотехнологии.

К антибиотикам относятся низкомолекулярные эффекторы изначально природного происхождения, способные подавлять рост живых клеток. Антибиотики, продуцируемые растительными объектами, называют фитонцидами. Вопрос о физиологических функциях антибиотиков, их месте в метаболизме и процессах эволюции окончательно не решен. Антибиотики возникли в борьбе за существование почвенных биоценозов, поэтому многие из них служат средствами нападения и защиты, т. е. представляют собой своеобразное химическое «оружие» клетки. Однако это не единственные функции у антибиотиков. Известно, что они могут участвовать в процессах детоксикации вредных метаболитов, контролировать некоторые стороны обмена веществ и целые процессы развития, например дифференцировку клеток, служить запасными питательными веществами. Некоторые исследователи рассматривают антибиотики как случайные вещества, обладающие полезными свойствами, другие считают их реликтовыми молекулами, вытесненными в ходе эволюции продуктами рибосомального синтеза, но и до сих пор сохранившими способность вмешиваться в биохимические процессы.

Способность нитчатого гриба зеленой плесени *Penicillium notatum*

вызывать гибель микроорганизмов впервые была установлена в 1928 г. английским микробиологом А. Флеммингом. Однако лечебные свойства этой плесени были описаны еще в 1871 г. русским дерматологом А. Г. Полотебновым. Количество открываемых антибиотиков постоянно растет. В 1940 г. было известно всего 6 антибиотиков, а в настоящее время описано более 12000 аналогичных соединений, из которых в клинике применяют около 200 препаратов. 97 % известных антибиотиков токсичны, поэтому в практике не используются. В химическом отношении они представляют сборную группу органических веществ. В зависимости от химической природы и ряда других свойств известные антибиотики делят на ряд классов:

1. β -Лактамные (пенициллины, цефалоспорины) составляют более 50 % рынка антибиотиков.
2. Тетрациклины (тетрацилин, морфоцилин, метацилин).
3. Макролиды (эритромицин, олеандомицин).
4. Аминогликозиды (гентамицин, амикацин).
5. Гликопептиды (ванкомицин, ристомицин).
6. Амфениколы (левомицетин).
7. Линкосамиды (линкомицин).
8. Полиеновые [противогрибковые (нистатин, леворин)].
9. Противоопухолевые (блеомицин) и др.

По типу действия антибиотики делят на бактерицидные (лактamные, аминогликозиды), вызывающие гибель микроорганизмов, и бактериостатические (макролиды, тетрациклины, левомицетин), нарушающие способность микроорганизмов делиться.

По спектру действия различают антибиотики узкого и широкого действия. К последним относят тетрациклины, макролиды, аминогликозиды, которые особенно полезны в случае неидентифицированных возбудителей болезни, однако при длительном применении они способны вызвать у пациентов дисбактериоз.

В последние годы достигнуты большие успехи в расшифровке молекулярного механизма действия антибиотиков. Наиболее яркая особенность антибиотиков — исключительная специфичность их действия. По выражению П. Эрлиха, антибиотики — это магические пули. Специфика действия их состоит в избирательном подавлении одного или нескольких процессов лишь некоторых микроорганизмов. Таким образом антибиотики блокируют метаболические мишени в клетках-мишенях. В зависимости от специфики действия антибиотиков на молекулярном уровне различают следующие группы соединений:

1. нарушающие биосинтез пептидогликанов клеточной стенки (пенициллины, ванкомицин, цефалоспорины);
2. нарушающие отдельные этапы процессов трансляции (амфениколы, аминогликозиды, тетрациклины, макролиды и др.);
3. повреждающие цитоплазматическую мембрану (грамидин, олимиксины);
4. нарушающие биосинтез нуклеиновых кислот (рифамицины, актиномицин D, противоопухолевые антибиотики);
5. нарушающие энергетический обмен (олигомицин, хлоргексидин).

Антибиотики широко используют в качестве молекулярных инструментов при исследовании фундаментальных проблем биологии, таких, как расшифровка тончайших механизмов биосинтеза белка, нуклеиновых кислот и структуры клеточных стенок бактерий, создание моделей транспорта ионов через биологические мембраны и др.

Изыскание новых антибиотиков обусловлено как потребностями практики, так и накоплением резистентных форм микроорганизмов по отношению ко многим антибиотикам. Устойчивость бактерий к пенициллинам и цефалоспорином создает присутствующий в их клетках фермент - лактамаза (пенициллиназа). Этот фермент гидролизует амидную связь

β -лактамного цикла в молекуле антибиотика с образованием пенициллиновой кислоты, которая полностью лишена антимикробной активности.

Специальное изучение объема и потенциала защитных свойств микроорганизмов показало, что их резистентность к антибиотикам имеет глобальный характер и обеспечивается как разнообразием фенотипов резистентности, так и разнообразием и стабильностью систем горизонтального генного транспорта. Поэтому главное направление получения новых антибиотиков состоит не в открытии новых соединений, а в химической трансформации природных молекул для создания полусинтетических антибиотиков, характеризующихся меньшей токсичностью и более широким спектром действия, большим временем жизни, химической и биологической устойчивостью. Важный подход на пути получения устойчивых аналогов антибиотиков — использование природных ингибиторов β -лактамаз — клавулановой и оливановой кислот.

Методы получения антибиотиков путем химического синтеза чрезвычайно сложны и не могут конкурировать с их биосинтезом методами биотехнологии. Существует несколько способов получения как природных, так и полусинтетических антибиотиков. Направленный биосинтез антибиотиков осуществляется путем прямой ферментации микроорганизма — продуцента с подходящим предшественником, что индуцирует синтез ферментов вторичного метаболизма в идиофазе. Точный механизм индуцирования первичными метаболитами генов, кодирующих синтез ферментов вторичного метаболизма, не расшифрован. Однако выявлено, что молекулы предшественника необходимо добавлять в среду в период фазы роста микроорганизма. Установлено, что вводимый предшественник должен лимитировать скорость биосинтеза антибиотика. Например, производство бензилпенициллина в значительной степени стимулируется добавками его метаболического предшественника — фенилуксусной кислоты. Аналогичный

эффект вызывает использование ингибиторов метаболизма. Так, при подавлении процесса введения хлора микроорганизм *S. aureofaciens* образует тетрациклин, а не хлортетрациклин, а при ингибировании реакции метилирования им синтезируется деметилированное производное хлортетрациклина.

Другой способ получения антибиотиков состоит в использовании для их биосинтеза блокированных мутантов, у которых отсутствует (блокировано) определенное звено в цепи реакций, ведущих к синтезу антибиотика. Блокированные мутанты не способны образовывать нужный антибиотик. Используя низкую субстратную специфичность ферментов вторичного метаболизма и наличие аналогов предшественников антибиотика, мутантные штаммы переводят их в аналоги самого антибиотика в ходе процесса, известного как мутационный биосинтез, или мутасинтез. Так, мутанты *Nocardia mediterranei*, у которых нарушена способность к ацилированию, образуют аналог предшественника рифамицина В-рифамицин SV, который служит исходным веществом для получения многих синтетических рифамицинов (препараты для лечения туберкулеза и проказы).

Особенно успешны разработки в области биосинтеза полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых более эффективных аналогов пенициллина основано на изменении природы его ацильной группировки при сохранении в неизменном виде ядра пенициллина — 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). В промышленности 6-АПК получают путем гидролиза природных пенициллинов с помощью специфического фермента — пенициллинацилазы, образующейся с высоким выходом в процессе ферментации ряда штаммов микроорганизмов.

Антибиотики продуцируются плесневыми грибами, актиномицетами, зубактериями и другими микроорганизмами. Среди актиномицетов наибольший вклад вносит род *Streptomyces*, один из видов которого — *S. griseus*

синтезирует более 50 антибиотиков. В процессе образования антибиотиков задействовано значительное число генов. Массовая расшифровка первичной структуры геномов микроорганизмов показала, что эта величина равна 1-2%. Так, у *Bacillus subtilis* число таких генов достигает 2 %, что обеспечивает микроорганизму большие возможности для защиты и адаптации. С другой стороны, это обстоятельство затрудняет анализ путей биосинтеза антибиотиков и идентификацию отдельных мутаций, способных увеличить выход продукта. Тем не менее, большинство известных в настоящее время высокопродуктивных штаммов продуцентов антибиотиков получено традиционными методами мутагенеза и селекции.

Биосинтез антибиотиков, как и любых других вторичных метаболитов, возрастает в фазе замедленного роста клеточной популяции (конец трофофазы) и достигает максимума в стационарной фазе (идиофазе). Считают, что в конце трофофазы изменяется энзиматический статус клеток, появляются индукторы вторичного метаболизма, освобождающие гены вторичного метаболизма из-под влияния катаболитной репрессии. Поэтому любые механизмы, тормозящие клеточную пролиферацию и активный рост, стрессовые ситуации, активируют процесс образования антибиотиков.

Процесс культивирования идиолитов проходит две фазы (двустепенчатое культивирование). На первой фазе происходит накопление достаточного количества биомассы, которая выращивается на среде для роста микроорганизма (эта фаза должна быть быстрой, а питательная среда дешевой). На второй фазе осуществляются запуск и активный синтез антибиотика (на этой фазе ферментацию ведут на продуктивной среде).

Образование антибиотиков регулируется условиями культивирования микроорганизмов. Поэтому оптимизация питательной среды является главным фактором в повышении выхода продукта.

Большинство антибиотиков получают при глубинной аэробной ферментации периодического действия в асептических условиях. Период

ферментации длится 7 - 10 суток. В последние годы внедряются полунепрерывные и непрерывные процессы ферментации. Технология завершающих стадий процесса определяется природой антибиотика, характером производства и целями дальнейшего использования антибиотиков. Для медицинских целей технология выделения и очистки имеет особое значение, поэтому включает сложные многоступенчатые комбинации различных операций: экстракцию подходящими растворителями, осаждение и перекристаллизацию из различных сред, фракционирование на ионообменных смолах, лиофильную и распределительную сушку готовых препаратов. Антибиотики выделяют или в виде сравнительно неочищенных препаратов (натриевая соль пенициллина), или виде высокоочищенных веществ (прокаиновая соль пенициллина), предназначенных для клинического использования. Выход антибиотиков обычно составляет несколько десятков граммов на 1 л.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 7

Определение спектра антибиотического действия

штаммов актиномицетов

Цель занятия.

1. Определить продукцию антибиотикоподобного вещества выданной культуры актиномицета.
2. Определить антибактериальную активность актиномицета по отношению к тест - культурам Г- и Г+ бактерий.

Реактивы и оборудование. Чашки Петри, петли, спиртовки, стандарт мутности №5, пипетки, пробирки, физ.раствор, пробочное сверло.

Объект исследования. Культура актиномицетов.

Ход работы.

1. Приготовить 6 чашек Петри с МПА (мясопептонным агаром).
2. Приготовить взвеси суточных культур тест-микроорганизмов: *E.coli*,

St. aureus, *B. subtilis* по стандарту мутности № 5. Засеять по 0,1 мл каждой культуры на 2 чашки Петри.

3. Вырезать агаровые блочки с культурой выданного актиномицета (с исходной чашки Петри), разложить их на агар с посевом тест-культур (по одной чашке Петри каждой культуры). Сторона, на которой растет актиномицет, должна быть обращена кверху.

4. Собрать фильтровальную установку и отфильтровать бульонную культуру актиномицета. Фильтровальную установку разобрать и подготовить к стерилизации.

5. В чашках Петри с посевом тест-культур (по одной чашке каждой культуры) вырезать агаровые блочки и удалить их из чашки в дез. раствор. На дно образовавшейся лунки внести фильтрат бульонной культуры актиномицета - цельный и в разведении 1:2, 1:4, 1:8. Разведения фильтрата приготовить в стерильной дистиллированной воде.

6. Через 24 - 48 часов произвести учет антибактериальной активности культуры актиномицета. Измерить диаметры зон задержки роста тест-культур в мм. Произвести количественную оценку антибактериального эффекта фильтрата бульонной культуры актиномицета.

Форма отчетности по практическим занятиям: ход выполнения задач должен быть описан в рабочем журнале, зарегистрированы полученные результаты, анализ данных представлен в виде графика, диаграммы или таблицы. По каждой задаче должны быть сформулированы выводы.

III. . МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Методы современной селекции - это генетическое конструирование, т.е . совокупность приемов, с помощью которых сознательно изменяют генетическую программу микроорганизмов.

Генетическое конструирование *in vivo* включает получение и выделение мутантов и использование различных способов обмена

наследственной информацией живых микробных клеток.

Генетическое конструирование *in vitro* основано на применении генетической инженерии, которая предполагает манипуляции на выделенной из организмов ДНК. Следует отметить, что такое разделение условно, поскольку указанные методы взаимосвязаны и сегодня все больше переплетаются друг с другом. Именно на этой основе разрабатываются универсальные подходы к генетическому конструированию различных видов микроорганизмов, имеющих промышленное значение.

Генетическое изучение микроорганизмов, создавшее фундамент для современной селекции, стало возможным только, когда были разработаны способы выделения клоновых культур, или клонов. *Клон - это генетически однородное потомство одной клетки*, например колония, возникшая из одной клетки при расewe культуры на плотной питательной среде. Исследуя свойства такой колонии, можно получить представление и о признаках породившей ее клетки. Клоновая по происхождению культура, наследственная однородность которой поддерживается отбором по специфическим признакам, называется штаммом. Получение и поддержание высокопродуктивных штаммов - основная задача селекционной работы.

Важнейшим методом селекции микроорганизмов является *отбор мутантов*, т.е. организмов с измененными наследственными признаками, которые появляются в результате мутаций. В самом широком смысле мутацию можно определить как внезапно возникающее наследуемое изменение в генетическом материале клетки.

Для получения промышленных штаммов - продуцентов используют различные способы обмена наследственной информацией живых микробных клеток, наиболее распространенным методом является конъюгация.

Конъюгацией называется процесс генетического обмена, сопровождаемый переносом генетической информации от клетки-донора к клетке -реципиенту, который осуществляется при непосредственном

контакте между собой.

По способности к конъюгативному переносу плазмиды делят на конъюгативные и неконъюгативные. Многие плазмиды, молекулярная масса которых превышает 25 МД, имеют генетические системы, детерминирующие перенос плазмид в другие клетки в результате конъюгации. Внехромосомные генетические элементы нередко изменяют фенотипические свойства клеток. Это связано с тем, что они могут нести детерминанты устойчивости к антибиотикам. Неконъюгативные плазмиды не содержат детерминантов, придающих бактериальным клеткам свойства генетических доноров, и поэтому они не способны самостоятельно передаваться от одних клеток к другим. Однако такие плазмиды могут быть перенесены в реципиентные клетки с помощью конъюгативных плазмид. Такой перенос называется мобилизацией. При этом неконъюгативная плазида является мобилизуемой, а конъюгативная - мобилизующей. Плазмиды могут находиться как в автономном, так и в интегрированном состоянии по отношению к хромосоме клетки-хозяина. В последнем случае, по существу, образуется коинтегра́т между плазмидой и хромосомой. Важным свойством конъюгативных плазмид является их способность к мобилизации хромосомных генов, которая используется для получения генетических рекомбинантов у бактерий. Для конъюгационного скрещивания культуры донора и реципиента смешивают и инкубируют совместно в питательном бульоне или на поверхности твердых агаризованных сред. В этих условиях клетки соединяются между собой при помощи конъюгационного мостика, через который в реципиентную клетку, начиная с сайта *oriT* плазмиды, поступает хромосома донора. При 37⁰С для переноса всей хромосомы требуется около 90 мин.

Конъюгация все чаще применяется при конструировании промышленных штаммов микроорганизмов. Используя этот метод, можно легко получать генетические рекомбинанты, проводить мобилизацию

неконъюгативных плазмид, создавать гибридные (коинтегративные) плазмиды, объединять различные плазмиды в одной клетке. Ярким примером создания микроорганизма с помощью переноса природных плазмид служит получение штамма *Ps. putida*, способного утилизировать большинство основных углеводов нефти.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 8

Передача F-фактора при конъюгации бактерий

Цель занятия. Выявить частоту образования трансконъюгантов при передаче фактора фертильности от штамма-донора *E.coli* К 13 (lac^+, F^+) штамму-реципиенту *E.coli* К 12 (lac^-, F^-).

Реактивы и оборудование. Стандарт мутности на 10 ед., пробирки, чашки Петри, бактериологическая петля, шпатели, термостат.

Объект исследования. Музейные штаммы *E.coli* К 13 (lac^+, F^+) и *E.coli* К 12 (lac^-, F^-).

Ход работы.

1. Приготовить взвеси культур штаммов донора и реципиента в стерильном физиологическом растворе по стандарту мутности до концентрации 1 млрд. м. к. в мл. Внести по 0,1 мл каждой культуры в пробирку со стерильным бульоном. Поместить смесь на 1 час 30 мин в термостат на 37^0 .

2. Приготовить ex tempore 100 мл среды Эндо, разлить по 20 мл в 5 чашек Петри.

3. Из инкубированной смеси культур 0,1 мл внести на среду Эндо в чашку № 1 и делать посев газоном, используя стерильный шпатель.

4. Смесь культур развести физ.раствором кратно от 10^{-1} до 10^{-6} . Из пробирок с разведениями 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} сделать высев 0,1 мл. на чашки Петри № № 2 -5. Все чашки поставить в термостат на 37^0 .

5. Через 24 - 48 часов определить число жизнеспособных клеток *E.coli*

К 12 на чашках.

6. Каждую колонию *lac*⁻ на чашках № 4 - 5 пересеять на отдельный сектор чашки с агаром Эндо и оттестировать на приобретение F-фактора нанесением 0,01 мл "мужского" фага f2.

7. Произвести учет числа колоний, лизированных фагом, и определить частоту переноса F-фактора от штамма-донора штамму-реципиенту в процентах (%).

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 9

Передача хромосомных маркеров при конъюгации бактерий

Цель занятия. Выявить частоту передачи хромосомного *lac*⁺ от штамма-донора *E.coli* Hfr C (*lac*⁺, *Str*⁻) штамму-реципиенту *E.coli* К 12 (*lac*⁻, *Str*⁺).

Реактивы и оборудование. Стандарт мутности на 10 ед., пробирки, чашки Петри, бактериологическая петля, шпатели, термостат.

Объект исследования. Музейные штаммы *E.coli* Hfr C (*lac*⁺, *Str*⁻) и *E.coli* К 12 (*lac*⁻, *Str*⁺).

Ход работы.

1. Приготовить взвеси культур штаммов донора и реципиента в стерильном физиологическом растворе по стандарту мутности до концентрации 1 млрд. м. к. в мл. Внести по 0,1 мл каждой культуры в пробирку со стерильным бульоном. Поместить смесь на 1-1,5 часа в термостат на 37⁰.

2. Приготовить 100 мл среды Эндо с добавлением 200 мкг/мл стрептомицина, разлить в 5 чашек Петри.

3. Сделать высев исходных культур петлей на среду Эндо со стрептомицином (чашка 1).

4. Инкубированную смесь культур развести теплым (подогретым на водяной бане до 37⁰) физ.раствором кратно от 10⁻¹ до 10⁻⁵. Из пробирок с

разведениями 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} сделать высев 0,1 мл. на среду Эндо со стрептомицином (чашки Петри № 2 - 5). Чашки поставить в термостат на 37° .

5. Через 24-48 часов произвести учет выросших колоний и их фенотипа, подсчитать частоту образования рекомбинантов в процентах (%).

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 10

Передача R-фактора при конъюгации бактерий

Цель занятия. Выявить частоту передачи R-фактора от штамма-донора *E.coli* M17 ($lac^{+}, T^{+}, L^{+}, Str^{-}$) штамму-реципиенту *E.coli* K 12 ($lac^{-}, T^{-}, L^{-}, Str^{+}$). Определить наличие трансконъюгантов.

Реактивы и оборудование. Стандарт мутности на 10 ед., пробирки, чашки Петри, бактериологическая петля, шпатели, термостат.

Объект исследования. Музейные штаммы *E.coli* K 12 ($lac^{-}, T^{-}, L^{-}, Str^{+}$).

Ход работы.

1. Приготовить взвеси культур штаммов донора и реципиента в стерильном физиологическом растворе по стандарту мутности до концентрации 1 млрд.мк.кл. в мл. Внести 0,1 мл культуры штамма-донора и 0,9 мл культуры штамма-реципиента в колбу с 10 мл стерильного бульона. Поместить смесь на 1-1,5 часа в термостат на 37° .

2. Приготовить 100 мл среды Эндо с добавлением антибиотиков: 200 мкг/ мл стрептомицина, 100 мкг/мл левомецетина и 100 мкг/мл тетрациклина. Разлить среду в 5 чашек Петри.

3. Инкубированную смесь культур развести физ.раствором кратно от 10^{-1} до 10^{-5} . Сделать высев в объеме 0,1 мл. на среду Эндо с антибиотиками. Все чашки поставить в термостат на 37° .

4. Через 24-48 часов произвести учет полученных результатов, подсчитав частоту образования рекомбинантов.

Форма отчетности по практическим занятиям: ход выполнения задач

должен быть описан в рабочем журнале, зарегистрированы полученные результаты, анализ данных представлен в виде графика, диаграммы или таблицы. По каждой задаче должны быть сформулированы выводы.

IV. МЕТОДЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Специфическое применение биотехнологических методов для решения проблем окружающей среды, таких, как переработка отходов, очистка воды, устранение загрязнений, составляет предмет *экологической биотехнологии*. Экологическая биотехнология — это новейший подход к охране и сохранению окружающей среды при совместном использовании достижений биохимии, микробиологии, генетической инженерии и химических технологий.

Круг проблем, решаемых экобиотехнологией, чрезвычайно широк — от разработки и совершенствования методологии комплексного химико-биологического исследования экосистем вблизи источников техногенных воздействий до разработки технологий и рекомендаций по рекультивации почвы, биологической очистке воды и воздуха и биосинтезу препаратов, компенсирующих вредное влияние изменения окружающей среды на людей и животных. В процессе круговорота загрязняющих веществ в экосистемах огромную роль играют микроорганизмы. Помимо использования деятельности микроорганизмов в пищевой, фармацевтической, химической промышленности и в генной инженерии появилась возможность их применения для переработки отходов жизнедеятельности человека. В связи с ростом городов и развитием промышленности возникли серьезные экологические проблемы: загрязнение водоемов, накопление ядовитых веществ, в том числе канцерогенных, бытового мусора и отходов, загрязнение воздуха.

Интенсивное ведение сельскохозяйственного производства предполагает использование химических средств для борьбы с вредителями

возделываемых растений. Эти средства, применяемые для борьбы с насекомыми, клещами возбудителями грибковых заболеваний растений и животных, с сорной растительностью и другими объектами живой природы, называют общим термином «пестициды». Пестициды обладают высокими токсическими свойствами избирательно. Одни токсичны для насекомых, другие для грибов, третьи для сорной растительности. Но нередко эти вещества оказываются токсичными и для теплокровных животных.

В борьбе с различными вредителями сельскохозяйственных культур растений, паразитами животных и человека использовали и используют широкий спектр пестицидов: хлорированные углеводороды (ГХЦГ, ДДТ), фосфорорганические препараты (хлорофос, метафос и др.), растительные вещества (пиретрум, никотин и др.), препараты кишечного действия (бура, бутадион) и другие. Токсичность и скорость действия препаратов зависит от формы применения. Применяют их в твердом, жидком и газообразном виде (растворы, аэрозоли, пасты, гранулы). Важно, что при всех назначениях и способах использования пестициды почти всегда попадают в почву, где продолжают свое действие на ее основных обитателей: бактерии, грибы, простейшие, а также беспозвоночные животные. Более того, многие из них способны накапливаться во внешней среде, особенно в почве, а также в органах диких и домашних животных, оказывая негативное воздействие на ряд жизненных функций организма. Поэтому их применение обуславливает непрерывный поиск новых эффективных и экологически безопасных препаратов. В связи с этим новые синтезированные препараты проходят всестороннее изучение на различных объектах живой природы.

В тоже время многие из созданных человеком низкомолекулярных соединений (ядохимикаты, детергенты) и высокомолекулярных полимеров оказываются устойчивыми к разложению микроорганизмами, что требует разработки более усовершенствованных технологий. Так для утилизации отходов применяют комплексы микроорганизмов и специальные

приборные устройства.

Многие из созданных человеком химических веществ проявляют биологическую активность: обладают мутагенными и канцерогенными свойствами, нарушают структуру клетки.

Веществами, обладающими опасным для человека действием являются:

1. проявляющие канцерогенный, мутагенный эффект: хлорорганические (ДДТ, полихлорпирен, полихлоркамфен, гексахлорбутадиен); производные дитиокарбаминовой кислоты (цирам, цинеб, ТМТД); производные карбаминовой кислоты (беномил, пиримор, бетанал); производные мочевины (каторан); другие (хлорофос, фталофос, дихлофос, гетерофос, каптан, базудин, фолфет и др.).
2. вызывающие резистентность у вредителей патогенов и сорняков: инсектициды и акарициды (ДДТ, токсафен, эндрин, малатион, фосмет, арамит); фунгициды (медный купорос, каптан, агрозан, Додин, фталан, родан, фигон).

Некоторые загрязняющие биосферу вещества по своему происхождению являются природными соединениями. Например, компонент древесины лигнин, образующийся в значительных количествах как отход целлюлозно-бумажной промышленности. К числу загрязняющих биосферу веществ природного происхождения принадлежат и многие ароматические и галогенсодержащие углеводороды.

Чужеродные вещества (ксенобиотики), попадая в организм человека и животных, претерпевают различную биотрансформацию: окисление, восстановление, гидролиз, конъюгацию и другие процессы с участием ферментных систем. Так, в реакциях окисления чужеродных веществ особое место занимают микросомальные монооксигеназы, а также комплексы мембранно-связанных ферментов с участием цитохромов Р-450. Биотрансформация чужеродных веществ под воздействием микроорганизмов и ферментов протекает в воде и почвах. Изучение этих реакций в почвах в немалой степени затруднено гетерогенностью среды и

адсорбцией ксенобиотиков, микроорганизмов и ферментов на частицах и коллоидах почв. Устойчивость многих ксенобиотиков в биосфере довольно высока. Например, ДДТ не исчезает из почвы до 30 лет, альдрин и гептахлор – до 15 лет, диэльдрин – до 25 лет. Некоторые ксенобиотики, подвергаясь распаду или трансформации, могут образовывать более устойчивые или токсичные продукты. Среди ксенобиотиков, вносимых человеком в биосферу, немалая часть относится к производным нафталина и салициловой кислоты. В превращении этих соединений участвует большое число микробных ферментов. Поэтому большое внимание уделяется влиянию пестицидов на почвенные микроорганизмы.

Необходимость исследования действия пестицидов на почвенную микрофлору обусловлена важнейшей ролью микроорганизмов в самоочищении почвы от ксенобиотиков, создании почвенного плодородия и оптимизации условий вегетации растений. Большую значимость приобретают разработки микробиологического способа очистки почвы от пестицидов. В связи с этим ведутся поиски и конструирование штаммов микробов – деструкторов пестицидов и интродукция их в природные экосистемы. Эти исследования необходимы не только для оценки новых препаратов, но и для разработки эффективных методов детоксикации и очищения почвы от продуктов разложения препаратов массового и длительного применения.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №11

Изучение действия пестицидов на численность микроорганизмов в почве

Цель работы: Выявить динамику численности почвенных микроорганизмов под действием различных доз пестицидов.

Реактивы и оборудование: трехмиллиметровое сито, фарфоровая ступка

с пестиком и резиновой насадкой, колбы Эрленмейера на 250 мл, пробирки, пипетки, шпатели, чашки Петри, питательные среды, сосуды для почвы, пестицид, качалка Шуттеля, автоклав, термостат, жаровой шкаф, рН-метр, концентрационный фотоэлектроколориметр, центрифуга и пр.

Объект исследования: пестицид, гетеротрофные бактерии, актиномицеты и плесневые грибы

Ход работы.

1. Подготовка почвы к исследованию.

Почва для экспериментальных исследований берется заранее из пахотного горизонта на глубине 3-20 см не менее 5 проб массой по 0.5 кг по принципу «конверта». В стерильном пакете пробы тщательно перемешивают для получения общего образца массой 2,5 кг. В лаборатории почву необходимо перебрать, удалить крупные частицы (камни, корни, листья), просеять через сито и определить влагоёмкость. Подготовленную таким образом почву разделить на 4 пробы по 0,5 кг, поместить в пластмассовые сосуды и использовать для постановки экспериментов.

2. Внесение пестицида в пробы почвы.

Пестицид (порошок, гранулы, паста и пр.) развести в той жидкости, в которой достигается лучшая растворимость. Объем растворителя для всех доз пестицида должен быть одинаковым. Использовать три дозы препарата: производственную концентрацию пестицида (ПКП), превышающие производственную концентрацию в 10 раз (10 ПКП) и в 100 раз (100 ПКП). Полученные дозы препарата внести в 3 сосуда с почвой, в четвертый (контроль) – пестицид не вносить. В контрольный сосуд внести только растворитель (без пестицида) в объеме одной дозы. На протяжении всего опыта все 4 сосуда должны находиться в одинаковых условиях: температура 28⁰С, влажность – 60%.

3. Подготовка почвы к исследованию и приготовление последовательных разведений суспензии.

Работу провести сразу после внесения пестицида в почву, а затем через 5, 15 и 30 суток. Для этого из каждого сосуда взять по 1 г почвы. Навеску почвы поместить в стерильную фарфоровую ступку и растереть пестиком с резиновой насадкой, добиваясь разрушения почвенных агрегатов и десорбции микробных клеток. Затем растертую массу увлажнить 1 мл воды, взятой из специально подготовленной стерильной колбы на 250 мл, содержащей 100 мл воды или 0.85 % физиологического раствора. Увлажненную в ступке почву, растирая в течение 5 мин, довести до пастообразного состояния и смыть стерильной водой из той же колбы, перенося весь объем (100 мл) воды со смесью в другую (пустую) подготовленную стерильную колбу такого же объема (250 мл). Таким способом приготовить навески, взятые из всех четырех сосудов с пробами почвы.

В результате смешивания 1 г почвы со 100 мл воды получить основные разведения (1:100) суспензий. Колбы с суспензиями установить на качалку Шуттеля для 15 минутного встряхивания, затем отстоять в течение 30 с и использовать для последующих разведений. Для этого из основного разведения (1:100) стерильной пипеткой перенести 1 мл суспензии в стерильную пробирку с 9 мл воды. Полученное разведение (1:1000) тщательно перемешать и из него 1 мл перенести в последующую пробирку по приведенной схеме:

$$1\text{ г почвы} + 100\text{ мл физ.раствора} = \text{разведение } 1:100 (10^{-2}),$$

$$1\text{ мл разведения } 1:100 + 9\text{ мл физ.раствора} = \text{разведение } 1:1000 (10^{-3}),$$

$$1\text{ мл разведения } 1:1000 + 9\text{ мл физ.раствора} = \text{разведение } 1:10000 (10^{-4}),$$

$$1\text{ мл разведения } 1:10000 + 9\text{ мл физ.раствора} = \text{разведение } 1:100000 (10^{-5}),$$

$$1\text{ мл разведения } 1:100000 + 9\text{ мл физ.раствора} = \text{разведение } 1:1000000 (10^{-6}).$$

4. Выделение микроорганизмов из почвы и получение чистых культур.

Полученные разведения почвы высеять на три среды: мясо-пептонный агар (МПА), крахмало-аммиачный агар (КАА) и сусло агар (СА) или Сабуро - для выделения трех систематико-физиологических групп микробов: актиномицетов, гетеротрофных бактерий и плесневых грибов. Актиномицеты и грибы выявлять поверхностным методом, высевая по 0.1 мл суспензии из разведения 10^{-2} в чашки Петри с разлитым агаром Сабуро или сусло, а из разведения 10^{-3} на КАА.

Состав КАА в г/л : крахмал растворимый – 20,0, K_2HPO_4 – 0,5, KNO_3 – 1,0, $MgSO_4$ – 0,5, $NaCl$ – 0,5 $FeSO_4$ – 0,01, вода дистиллированная, pH – 7,2 – 7,3.

Состав среды Сабуро: пептон – 1%, мальтоза - 4%, агар-агар – 3%, вода дистиллированная, pH – 5 – 5,5.

После высева материал стерильным шпателем растереть по поверхности агара. Посев материала из каждого разведения осуществлять на три чашки. Перед посевом все чашки Петри с агаром подсушить в термостате.

Гетеротрофные бактерии выявлять глубинным методом посева суспензии. Для этого 1 мл взвеси из разведения 10^{-5} вылить на дно стерильной чашки Петри и затем залить 15-20 мл расплавленным и остуженным до $45^{\circ}C$ МПА. Легкими круговыми движениями среду с посевным материалом аккуратно перемешать. После застывания МПА посева поместить в термостат для культивирования.

Важным условием дальнейшей микробиологической работы является изолирование отдельных видов бактерий и получение чистых культур, т.е. таких культур, которые содержат один вид какого-либо микроорганизма. Известно много методов получения чистых культур. Широко используются: метод последовательных разведений или фракционный метод Пастера, пластинчатых разводов по Коху, изолирование отдельных клеток по способу Дригальского, а также высев на различные дифференциальные среды.

5. Анализ полученных данных.

Количественные показатели, полученные при подсчете колоний микробов, занести в журнал, анализируя и формируя таблицы для каждой систематико-физиологической группы.

Количество микробов, содержащееся в одном грамме контрольной почвы, следует принять за 100%, а численность микроорганизмов в почве с пестицидом отражать в процентах по отношению к контролю.

Примерное оформление результатов приведено в таблице 5.

Таблица 5

Влияние различных доз пестицида на численность гетеротрофных бактерий

Доза препарата, мг/кг	Экспозиция, сут							
	0		5		15		30	
	Число м.к. в 1 г почвы ($\times 10^n$)	%	Число м.к. в 1 г почвы ($\times 10^n$)	%	Число м.к. в 1 г почвы ($\times 10^n$)	%	Число м.к. в 1 г почвы ($\times 10^n$)	%
1	13	118	23	127	28	127	25	108
10	11	100	30	166	38	172	32	139
100	12	109	32	177	30	136	25	108
Контроль	11	100	18	100	22	100	23	100

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 12

Определение чувствительности микроорганизмов к пестицидам

Пестициды, как правило, оказывают синергетическое или антибактериальное действие при контакте с микроорганизмами. Явление синергизма может объясняться использованием микроорганизмами отдельных элементов пестицида, в частности углерода, для своего питания. Антибактериальное действие – воздействие препарата на физиологические функции микробов, в результате которого происходит снижение биологической активности и даже гибель их.

Цель работы – выявить стимулирование или угнетение роста микроорганизмов в присутствии пестицида.

Реактивы и оборудование: чашки Петри, пробирки, физиологический раствор, стандарт мутности на 5 единиц, термостат.

Объект исследования – чистые культуры микроорганизмов, выделенные из почвы с пестицидом.

Ход работы:

1. Внесение пестицида в среды.

Для каждой систематико-физиологической группы микроорганизмов (актиномицеты, гетеротрофные бактерии, грибы) разлить по две колбы соответствующих сред: КАА, МПА, Сабуро. Стерилизовать в автоклаве: МПА - при 1 атм в течение 20 мин, КАА и Сабуро – при 0.5 атм 30 мин. После стерилизации питательные среды охладить до 45⁰С и в колбы внести пестицид с таким расчетом, чтобы конечная концентрация препарата в среде составила 0.003%. Сухие препараты предварительно растворить в ацетоне, спирте или другом растворителе и добавить такой же объем растворителя в контрольные колбы (без пестицида). Затем среды хорошо перемешать, разлить в стерильные чашки Петри и оставить при комнатной температуре до полного застывания. Поверхность агаризованных сред перед посевом подсушить для удаления конденсатной воды. Для этого чашки поместить в термостат крышками вниз и оставить на сутки. После подсушивания среды использовать в работе.

2. Высев микроорганизмов на питательные среды, содержащие пестицид.

Для изучения чувствительности к пестицидам полученные чистые культуры микробов засеять в чашки Петри с питательными средами, содержащими тот или иной препарат. Для этого обычно используют суточные культуры гетеротрофных бактерий, 3-5 - суточные культуры актиномицетов и грибов. Гетеротрофные бактерии выращивают на скошенном МПА, актиномицеты -

на КАА, грибы - на Сабуро или сусло агаре. Смывы и взвеси микробов готовить с помощью стерильного физиологического раствора. Содержание микробных клеток определить по оптическому стандарту мутности (ГНКИ). Обычно используют стандарт (5 ед.), содержащий 500 млн м.к. в 1 мл.

Посев взвесей исследуемых культур проводить методом отпечатков или уколом на поверхность питательной среды, содержащей пестицид (опыт) и без него (контроль). Высев каждой культуры в опыте и контроле осуществлять трехкратно для получения достоверных результатов. Чашки с посевами культивировать в термостате при температуре 28⁰С в течение 2-5 суток.

3. Анализ полученных данных.

После инкубации учесть диаметр выросших колоний и сравнить с ростом аналогичных культур в контроле и опыте. Торможение и стимулирование роста штаммов рассчитать по формуле Эббота:

$$T = \frac{D_k - D_o}{D_k} \times 100 \%,$$

где T – торможение (подавление) роста по сравнению с контролем, %;

D_k – диаметр колоний в контроле, мм; D_o – диаметр колоний в опыте, мм.

В случае стимулирования роста микробов показатель T (торможения) имеет отрицательное значение, а при подавлении их роста – положительное.

Результаты записать в таблицу. Примерное оформление результатов дано в таблице 6.

Таблица 6

Чувствительность чистых культур гетеротрофных бактерий к пестициду

Штаммы	Диаметр колонии, мм		Торможение роста, %
	в контроле	в опыте	
1	6	7	-16,6
8	10	9	10
23	7	17	-142,8

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 13

**Определение способности использования микроорганизмами
углерода из пестицидов**

Считается, что для питания и энергии микроорганизмы используют самые различные химические соединения. Это зависит от вида и экологической адаптации к природному субстрату при определенных условиях среды. Некоторые виды и штаммы приспосабливаются к использованию отдельных элементов, составляющих тот или иной пестицид. В результате происходит трансформация (преобразование) пестицида с последующей утратой токсических свойств. Такое преобразование пестицида определяется способностью химического соединения индуцировать у микроба синтез ферментов подготовительного цикла, зависящего от структуры молекулы пестицида и природного аналога. Различают два типа трансформации ксенобиотиков:

- микробы способны интенсивно расти, размножаться и накапливаться, используя пестицид в качестве источника питания,
- микробы не способны усваивать пестицид в процессах метаболизма, но в присутствии ростовых субстратов происходит индукция синтеза соответствующих ферментов, катализирующих способность трансформировать химическое соединение. Эта особенность получила название кометаболизма, т.е. сопряженных ферментативных реакций обмена, при котором ко субстраты (пестициды) влияют на рост и развитие микробов только в присутствии ростовых органических соединений.

Цель работы: выявить способность микроорганизмов усваивать углерод из субстрата.

Реактивы и оборудование: чашки Петри, пробирки, питательные среды.

Объект исследования: культуры микроорганизмов имеющие отрицательный коэффициент торможения.

Ход работы:

1. Высев микроорганизмов на питательные среды.

Выполнение данной работы следует проводить с использованием чистых культур бактерий, обладающих отрицательным коэффициентом торможения, и специальной безуглеродной среды (М 9), содержащей различные углеродные субстраты: дрожжевой автолизат (ДА) или глюкозу (Г), пестицид (П) или оба соединения одновременно.

Состав среды М9: Na_2HPO_4 – 24 г, KH_2PO_4 – 12 г, NaCl – 2 г, NH_4Cl – 4 г, вода дистиллированная – 1000 мл.

В среду добавить индикатор бромтимоловый синий для выявления бактерий деструкторов. Высев исследуемых культур на агаровые пластинки осуществлять методом отпечатков или уколом.

Питательную среду, содержащую ДА (или Г), используют в качестве контроля роста микробов. Среда, содержащая только пестицид (единственный источник углерода), служит показателем использования его как источника питания микроорганизмов, а в среде, содержащей препарат и дрожжевой автолизат (или глюкозу), выявляют бактерии, разлагающие пестицид в условиях кометаболизма.

2. Анализ полученных данных.

После инкубации посевов в термостате при температуре 28°C необходимо отметить наличие или отсутствие роста микроорганизмов и зон просветления вокруг выросших колоний бактерий. Полученные результаты занести в таблицу, проанализировать и отметить штаммы-деструкторы. Примерное оформление результатов представлено в таблице 7.

Таблица 7

Способность микроорганизмов использовать углерод пестицида

Штаммы	Среды культивирования		
	М9 + ДА (Г)	М9 + П + ДА (Г)	М9 + П
1	+	+	-
23	+	+	±
36	+	-	+

Примечание: «+» – наличие зоны просветления; «-» отсутствие зоны просветления; «±» – сомнительный результат.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 14

Изучение деструктивного влияния микроорганизмов на пестициды

Цель работы: изучить деструктивную активность штаммов микроорганизмов по отношению к пестициду.

Реактивы и оборудование: колбы Эрленмейера, круговая качалка, концентрационный фотоэлектроколориметр (ФЭК, КФК-2), центрифуга, пробирки, пипетки, стандарт мутности на 5 единиц, безуглеродная синтетическая среда.

Объект исследования: штаммы бактерий, использующие пестицид в качестве единственного источника углеродного питания, пестицид.

Ход работы:

1. Посев исследуемых культур на среду.

В данной работе используются культуры бактерий-деструкторов пестицидов, отобранные в предыдущих опытах. Среди этих культур необходимо отобрать штаммы с явными признаками роста и размножения в присутствии пестицида как единственного источника углерода и изучить их роль в превращении препаратов. Для этого суточные культуры штаммов – деструкторов засевают (500 млн м.к.) в колбы Эрленмейера, содержащие 100

мл синтетической среды М 9 с внесенным в нее 200-500 мкг/мл пестицида.

Измеряют оптическую плотность сред и культивируют в термостате при 28⁰С. Аэрацию среды осуществляют с помощью круговой качалки.

2. Измерение концентрации пестицида и микроорганизмов.

Изменение концентрации пестицида и прирост биомассы штаммов отмечают помощью концентрационного фотоэлектроколориметра (ФЭК, КФК-2) в течение нескольких дней.

Для измерения оптической плотности культуральную жидкость необходимо предварительно отцентрифугировать при 8000 об/мин в течение 20 мин. После центрифугирования в супернатанте (надосадочная жидкость) определить концентрацию пестицида по отношению к контролю (среда М 9). Полученный центрифугат разбавить физиологическим раствором и определить концентрацию микробных клеток.

3. Построение калибровочных графиков для количественного определения концентрации пестицида и микроорганизмов.

Для количественного определения концентрации пестицида и микробных клеток строят калибровочные графики, отражающие зависимость оптической плотности от концентрации пестицида и микроорганизмов. С этой целью готовят серии разведений с различными концентрациями пестицида и микробов в среде М 9 и измеряют их оптическую плотность. Полученную зависимость выражают графически, откладывая на оси ординат оптическую плотность, а по оси абсцисс – концентрацию препарата и микробных клеток. Для каждой культуры микроорганизмов строят свою калибровочную кривую, так как оптическая плотность зависит от размеров клеток.

ПЕРЕЧЕНЬ КОНТРОЛЬНЫХ ВОПРОСОВ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ

1. Методы повышения продуктивности промышленных штаммов микроорганизмов.
2. Задачи селекционной работы с микроорганизмами и пути их решения.
3. Методы современной селекции микроорганизмов.
4. Требования к промышленным штаммам-продуцентам.
5. Первичные и вторичные метаболиты.
6. Принципы получения первичных и вторичных метаболитов.
7. Классификация антибиотических веществ, продуцируемых микроорганизмами. Основные продуценты антибиотиков.
8. Получение аминокислот и ферментов в микробиологическом производстве.
9. Микробиологический синтез витаминов.
10. Понятие о мутагенезе и методах выделения мутантов.
11. Индуцированный мутагенез и отбор продуктивных мутантов.
12. Ступенчатый отбор, преимущества и недостатки метода.
13. Методы генетического конструирования микроорганизмов *in vivo*.
14. Конъюгация у бактерий.
15. Характеристика плазмид, понятие о группах несовместимости.
16. Конъюгативные и неконъюгативные плазмиды, этапы конъюгации.
17. Трансдукция у бактерий, специфическая и общая трансдукция, трансфекция.
18. Умеренные и вирулентные фаги, их использование в биотехнологии.
19. Методы экологической биотехнологии.
20. Классификация пестицидов по химической природе и объектам действия.
22. Микробиологическая и химическая деградация пестицидов в почве.
23. Взаимовлияние пестицидов и почвенных микроорганизмов.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основной

1. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений /Под ред. Р. Г. Бутенко. — М., 1991.
2. Биотехнология растений: культура клеток / Под ред. Р. Г. Бутенко. — М., 1989.
3. Биотехнология /Под ред. А.А.Баева.-М., 1984. - 320 с.
4. Биотехнология. Принципы и применение. - М., 1988. - 480 с.
5. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. — М., 1999.
6. Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Кизкин А.Ф. и др. Биотехнология. Клеточная инженерия. - М., 1987. - 128 с.
7. Быков В.А., Манаков М.Н., Панфилов В.И. и др. Биотехнология. Производство белковых веществ. - М., 1987. - 144 с.
8. Быков В.А., Крылов И.А., Манаков М.Н. и др. Биотехнология. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. - М., 1987. - 144 с.
9. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Биотехнология. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. - М., 1988. - 210 с.
10. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - М., 1989. — 478 с.
11. Елинов Н.П. Биотехнология. - М., 1996. - 620 с.
12. Егоров Н.С., Олескин А.В., Самуилов В.Д. Биотехнология. Проблемы и перспективы. - М., 1987. - 160 с.
13. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. — М., Изд-во Академия, 2003. — 208 с.
14. Зудин Д.В., Кантере В.М., Угодчиков Г.А. Биотехнология. Автоматизация биотехнологических исследований. - М., 1987. - 112 с.
15. Мишустин Е.Н. Биотехнология. — М., 1989.
16. Муромцев Г. С, и др. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. — М., 1990.
17. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. — М., 1987.
18. Сельскохозяйственная биотехнология /Под ред. В.С.Шевелухи. — М., 1998.
19. Сидоров В. А. Биотехнология растений. — Киев, 1990.
20. Фогарти М. и др. Микробные ферменты и биотехнология. — М., 1986.
21. Экологическая биотехнология. — Л., 1990

Дополнительный

1. *Бейли Дж.Э., Оллис Д.Ф.* Основы биохимической инженерии. — М., 1989.
2. *Безбородое А. М.* Основы биотехнологии микробных синтезов. — Ростов, 1989.
3. *Березин И. В., Клесов А.А.* Инженерная энзимология. — М., 1987.
4. Биосенсоры // Итоги науки и техники. Сер. «Биотехнология». — М.: ВИНТИ, 1990. -Т. 26.
5. Биотехнология, охрана среды. — М., 1990.
6. Биотехнология: Принципы и применение. — М., 1988.
7. *Буков В.А.* Производство белковых веществ. — М., 1987.
8. *Воробьева Л.И.* Техническая микробиология. - М., 1987: - 168 с.
9. *Катаева Н. В., Бутенко Р. Г.* Клональное микроразмножение растений. — М., 1983.
10. *Кефели В. И., Дмитриева Г. А.* Биотехнология. — Пушкино, 1989.
11. *Кучек Н. В.* Генетическая инженерия высших растений. — Киев, 1997.
12. Метаболизм микроорганизмов: Практикум под ред. Н.С. Егорова. — М: Изд-во МГУ, 1986.
13. Новые направления биотехнологии: Материалы международной VIII конференции. — М., 1998.
14. *Ньюсхолм Э., Старт К.* Регуляция метаболизма. - М., 1997. - 408 с.
15. Промышленная микробиология: Учебное пособие под ред Н.С. Егорова. — М., 1989. — 688 с.
16. Промышленная микробиология и успехи генетической инженерии. — М., 1984.
17. *Рыбальский Н. Г., Скуратовская О. Д.* Белковая инженерия. — М., 1990.
18. *Скрябин Г., Головлева Л.* Биотехнология защиты окружающей среды от ксенобиотиков // Изв. АН СССР. Сер. «Биология». — М., 1986. — № 6. — С. 805-813.
19. *Спирин А. С.* Биосинтез белка и перспективы бесклеточной биотехнологии // Вестник АН СССР. - М., 1989. — № 11. - С. 30-38.
20. *Терещин И.М.* Молекулярно-биологические основы биотехнологии. — Л., 1981.
21. *Шабарова З.А., Богданов А. А., Золотухин А. С.* Химические основы генетической инженерии. — М., 1994.
22. *Шендеров Б.А., Глухов Н.В.* Учебно-методическое пособие по генетике бактерий. - Саратов, 1979. - 20 с.
23. Ферментные электроды // Итоги науки и техники. Сер. «Биотехнология». - М.: ВИНТИ, 1988. - Т. 18.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
РАБОЧАЯ ПРОГРАММА КУРСА БИОТЕХНОЛОГИИ	6
I. ОСНОВЫ ФИТОБИОТЕХНОЛОГИИ	13
1.1 Методы культуры изолированных частей растений различного уровня организации в биотехнологии растений	13
1.2. Основные сведения о стерилизующих веществах, питательных средах и их приготовлении	21
1.3. Практика микроклонального размножения и оздоровления растений	29
Лабораторное занятие № 1. Получение безвирусных растений с помощью культуры апикальных меристем побега	30
Лабораторное занятие № 2. Получение каллусов из стеблевой части ценных видов, пород и сортов растений	34
Лабораторное занятие № 3. Культивирование первичного каллуса на агаризованной питательной среде	36
Лабораторное занятие № 4. Регенерация растений из первичных эксплантов путем прямого органогенеза (на примере <i>Begonia</i>)	38
II. МЕТОДЫ ТЕХНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ	40
2.1. Принципы отбора штаммов-продуцентов. Понятие о первичных и вторичных метаболитах	40
2.2 Наиболее перспективные для промышленности микробные экзополисахариды	42
Лабораторное занятие № 5. Отбор штаммов - продуцентов экзополисахаридов, имеющих промышленное значение	50
2.3 Биотехнология получения первичных метаболитов. Производство витаминов	51
Лабораторное занятие № 6. Изучение биосинтеза витамина В ₁₂ азотобактером	54
2.4 Биотехнология получения вторичных метаболитов. Получение антибиотиков	55
Лабораторное занятие № 7. Определение спектра антибиотического действия штаммов актиномицетов	62
III. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ	63
Лабораторное занятие № 8. Передача F-фактора при конъюгации бактерий	66
Лабораторное занятие № 9. Передача хромосомных маркеров при конъюгации бактерий	67
Лабораторное занятие № 10. Передача R-фактора при конъюгации бактерий	68
IV. МЕТОДЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ	69
Лабораторное занятие № 11. Изучение действия пестицидов на численность микроорганизмов в почве	72
Лабораторное занятие № 12. Определение чувствительности микроорганизмов к пестицидам	76
Лабораторное занятие № 13. Определение способности использования микроорганизмами углерода из пестицидов	79
Лабораторное занятие № 14. Изучение деструктивного влияния микроорганизмов на пестициды	81
ПЕРЕЧЕНЬ КОНТРОЛЬНЫХ ВОПРОСОВ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ	83
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	84