

## Лекция № 1

### Тема: Этапы и методы выделения и скрининга продуцентов биотехнологии

#### План

1. Этапы и методы получения накопительных и чистых культур.
2. Биохимические методы получения накопительных и чистых культур бактерий
3. Биофизические методы получения культур
4. Биологические методы получения культур.
5. Хранение культур.

Биохимические методы получения накопительных и чистых культур бактерий основаны на их способности усваивать определенный вид субстрата или особенностях физиологии потребления химических соединений.

**Азот как субстрат для бактерий рода *Azotobacter*.** Азот, имеющийся в атмосфере, способны использовать только прокариоты. Самостоятельно или в симбиозе с высшими растениями они могут переводить инертный азот в органические соединения и включать его (непосредственно или через растения) в белок, который в конечном счете переходит в почву. Способность микроорганизмов усваивать молекулярный азот и строить из него азотсодержащие соединения клетки называется азотфиксацией. К числу наиболее активных свободноживущих азотфиксаторов относятся виды *Azotobacter*.

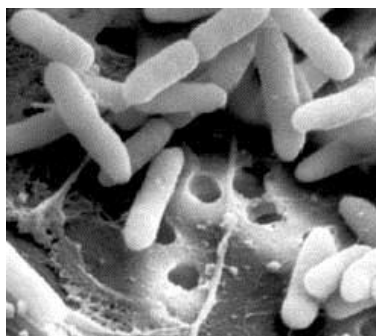
Для выделения *A. chroococcum* приготовят среду состава (г/л):

|                             |        |                       |        |
|-----------------------------|--------|-----------------------|--------|
| вода дистиллированная, 1000 |        |                       |        |
| маннит                      | - 2,0; | $K_2HPO_4$            | - 0,5; |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$       | - 0,2; | $FeSO_4 \times 7H_2O$ | - 0,1. |

Как видно из состава, в питательную среду отсутствует азотсодержащие соединения. Поэтому в такой среде вырастут только те продуценты, которые способны азот фиксировать из атмосферы.

#### **Органические кислоты как субстрат для бактерий рода *Pseudomonas***

Некоторые виды рода *Pseudomonas*, относящиеся к аэробам, можно получить в виде накопительных и чистых культур, используя их способность расти на среде с нитратом как источником азота, а также с солями различных органических кислот в качестве источников углерода и энергии. Бактерии рода *Pseudomonas* – правильные мелкие грамотрицательные палочки, подвижные (рисунок 1).



**Рисунок 1 – Морфология клеток бактерий *Pseudomonas aeruginosa***

В качестве примера можно привести метод, в котором используется триптофан как субстрат для псевдомонад. Для получения накопительной культуры псевдомонад, способных использовать триптофан как единственный источник углерода и азота, используют среду с триптофаном (г/л):

|                       |          |                        |          |
|-----------------------|----------|------------------------|----------|
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | – 0,2;   | $CaCl_2$               | – 0,02;  |
| $K_2HPO_4$            | – 1,0;   | $NaMoO_4 \times 2H_2O$ | – 0,001; |
| $MnCl_2 \times 4H_2O$ | – 0,002; | триптофан              | – 1,0;   |
| $FeSO_4 \times 7H_2O$ | – 0,05;  | дистиллированная вода  |          |

Источником выделения продуцентов рода *Pseudomonas* используют почву. После трех дней инкубации делают посев из отдельных колоний на скошенную в пробирка агаризированную питательную среду.

### **Получение накопительной культуры молочнокислых бактерий**

Общим признаком молочнокислых бактерий является способность осуществлять сбраживание углеводов (моно- и дисахаров) с образованием молочной кислоты (молочнокислое брожение). Инокулятом для получения накопительных культур молочнокислых бактерий могут служить молочнокислые продукты.

В качестве питательной среды используют стерильное молоко, а также ряд селективных питательных сред:

*Бликфельда. Среда Бригса в модификации Шарпа, дрожжевую, капустную и другие.*

*Среда МРС.*

*Жидкая среда МРС.* В мерную колбу вместимостью 1 дм<sup>3</sup> помещают 10 г пептона, 2 см<sup>3</sup> дрожжевого экстракта, 20 глюкозы, 1 см<sup>3</sup> твина-80, 2 г калия фосфата двузамещенного, 5 г натрия ацетата, 2 г триаммония цитрата, 0,2 г магния сульфата, 0,05 г марганца сульфата ( $MnSO_4 \times 4H_2O$ ), доливают до метки мясной водой. Растворяют компоненты нагреванием на водяной бане и устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял

( $6,5 \pm 0,1$ ) при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Среду разливают по  $10\text{ см}^3$  в стерильные пробирки и стерилизуют в автоклаве при  $(121 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин. Пробирки с питательной средой хранят при температуре  $(4 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  не более 30 суток.

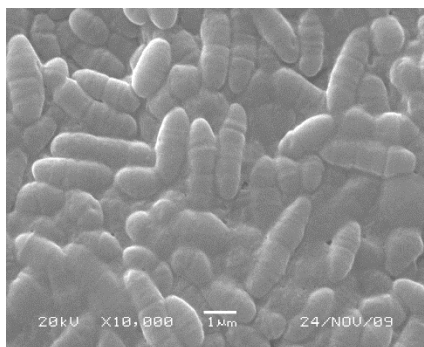
*Агаризированная среда МРС.* К  $1\text{ дм}^3$  жидкой среды МРС добавляют 15–18 г агара. После растворения компонентов среду разливают в стерильные колбы и автоклавируют 15 мин при  $(121 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Готовую среду хранят при температуре  $(4 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  не более 30 суток.

### **Лактат как субстрат для получения накопительной культуры пропионовокислых бактерий**

Для получения накопительной культуры бактерий семейства *Propionibacteriaceae*, вызывающих пропионовокислое брожение, используют элективные анаэробные условия и состав субстрата. В отличие от многих бактерий, пропионовокислые бактерии хорошо утилизируют лактаты, поэтому зрелые сыры («Швейцарский», «Алтайский») успешно используют для выделения пропионовокислых бактерий. Селективными условиями являются минеральная среда, содержащая 4% лактата Na и 1000 мкг/мл сульфаниламида. Пропионовокислые бактерии хорошо используют лактат в присутствии дрожжевого экстракта (2–5 %) или бесклеточного экстракта молочнокислых бактерий. В качестве источников углерода для культивирования пропионовокислых бактерий используют среды, содержащие глюкозу, лактозу, пируват, глицерин. Пропионовокислое брожение сопровождается образованием нелетучих дикарбоновых кислот (яблочной, фумаровой, янтарной), кетокислот (щавелевоуксусной, пировиноградной) как промежуточных продуктов и монокарбоновых летучих кислот (пропионовой, уксусной, следов муравьиновой) как конечных продуктов. Накопление и соотношение органических кислот зависит от видовой принадлежности штамма, состава среды, аэрации и других факторов.

### **Выделение культур бифидобактерий**

Бифидобактерии – грамположительные микроорганизмы, имеют неправильную форму клеток, изменяющуюся при старении культуры (рисунок 4). Они требовательны к источникам питания и факторам роста. В.Ф. Семенихина показала, что выделение бифидобактерий удобно производить на следующих средах. На основе бифидобактерий создано большое количество пробиотических лекарственных препаратов.



#### **Рисунок 4 – Морфология клеток бифидобактерий**

*Печеночно-цистиновая среда по Блауроку*: 500 г мелко нарезанной печени кипятят в литре дистиллированной воды в течение двух часов, содержимое отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр. Фильтрат доливают до 1 литра водой и добавляют следующие ингредиенты: пептон – 10,0 г; цистин – 1мл раствора концентрации 1:10000; NaCl – 5,0 г; агар – 20,0 г; лактоза – 10,0 г; pH среды – 7,0-7,2.

*Среда по Хенелю* (без сорбиновой кислоты): томатный сок – 400 мл мясной гидролизат по Хоттингеру – 10 мл; панкреатический – 100 мл; агар – 20 г; перевар казеина и дрожжевой автолизат – 100 мл; дистиллированная вода – 370 мл; pH среды 7,0. При необходимости добавляют 0,04 % сорбиновой кислоты. Бактерии можно изолировать и на агаризированной среде с дрожжевым автолизатом и лактозой (1 %).

В.Ф. Семенихина рекомендует для выделения *Bifidoobacterium bifidum* использовать девятое и десятое разведение фекалий. При этом наиболее крупные колонии бифидобактерий (1,5– 4 мм) вырастают на среде по Хенелю, а мелкие – на печеночно-цистиновом агаре (0,5–2 мм). На нем обнаруживается наибольшее число ветвящихся клеток, а среда по Хенелю способствует образованию булавовидных и веретенообразных форм. Указанные среды пригодны и для хранения *Bifidoobacterium bifidum* (при 2–5 °С).

#### **Этиловый спирт как субстрат для уксуснокислых бактерий**

Уксуснокислые бактерии имеют большое значение как продуценты уксуса. В настоящее время в семейство *Acetobacteriaceae* объединены 14 родов: *Acetobacter*, *Acidiphilium*, *Acidisphaera*, *Acidocella*, *Acidomonas*, *Craurococcus*, *Asaia*, *Gluconoacetobacter*, *Gluconobacter*, *Paracraurococcus*, *Rhodopila*, *Roseomonas*, *Stella*, и *Kozakia*. Виды различаются по способности развития на средах с высокими концентрациями ацетата и глюкозы. Бактерии хорошо растут на D-маннитоле. Названия родов *Acetobacter* и *Gluconobacter* в этом семействе были известны еще, начиная с 1898 и далее до 1935 гг., но таксоны остальных родов выделены и опубликованы только после 1989 года.

У всех уксуснокислых бактерий метаболизм дыхательного типа, никогда бродильного нет. Каталазоположительные и оксидазоотрицательные. Желатину не разжижают, индол и  $H_2S$  не образуют. Окисляют этанол до уксусной кислоты. Окисляют ацетат до  $CO_2$  и  $H_2O$  в зависимости от его концентрации в среде. Большинство представителей родов семейства *Acetobacteriaceae* (кроме *Asaia*) окисляет одно- и многоатомные спирты. Этиловый спирт окисляют в уксусную кислоту. После полного окисления спирта бактерии рода *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* и *Acidomonas* окисляют уксусную кислоту дальше до  $CO_2$  и  $H_2O$ , вследствие чего, их называют «переокислителями».

Среди уксуснокислых бактерий имеются представители, способные синтезировать внеклеточный полимер бактериальную целлюлозу. Так, например, виды *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter hansenii*. До 1998 года целлюлозосинтезирующие бактерии *Acetobacter xylinum* в научной литературе рассматривали как отдельный вид. В 1998 этот вид был снова переклассифицирован как *Gluconacetobacter xylinus*. Вид *Acetobacter hansenii* был реклассифицирован как *Gluconacetobacter hansenii* в 1998 г. автором Yamada. Классификация видов семейства *Acetobacteraceae* на основе анализа последовательности рибосомальной 16S рРНК.

Получение накопительной культуры уксуснокислых бактерий основано на их высокой, по сравнению с другими микроорганизмами, устойчивости в отношении уксусной кислоты и способности к окислению спиртов. Культуру уксуснокислых бактерий можно получить на пиве, пользуясь различным отношением к реакции питательной среды и температуре этих бактерий. Они в основном имеют морфологию цилиндрической формы клеток (рисунок 3).



**Рисунок 3 – Морфология клеток уксуснокислых бактерий рода *Acetobacter***

При достаточной кислотности вырастают уксуснокислые бактерии. Чем ниже температура среды, тем выше должна быть кислотность, чтобы развитие пленчатых дрожжей было подавлено.

## **2.2 Биофизические методы получения чистых и накопительных культур бактерий**

Биофизические методы основаны на ряде свойств продуцентов: устойчивости к высокой и низкой температуре, подвижности, мелкие размеры.

### **Использование подвижности клеток для получения накопительной культуры *Proteus vulgaris***

Для получения бактерий из группы *Proteus* используют сырое мясо, которое оставляют в стакане с водой на ночь при комнатной температуре; утром из замутившейся воды делают посева на 5–7 %-й МПЖ и, когда вырастут колонии, отмечают те, которые отличаются фигурным ростом (колонии-рои). Биомассу на бактериологической петле культуры этих колоний переносят в конденсационную воду в пробирки со скошенным МПА и инкубируют при 37 °С. Через несколько дней беловатый налет *Proteus* начинает постепенно подниматься снизу вверх по поверхности агара вследствие исключительной подвижности этого вида. Бактерии рода *Proteus* имеют клетки различной морфологии (рисунок 4).

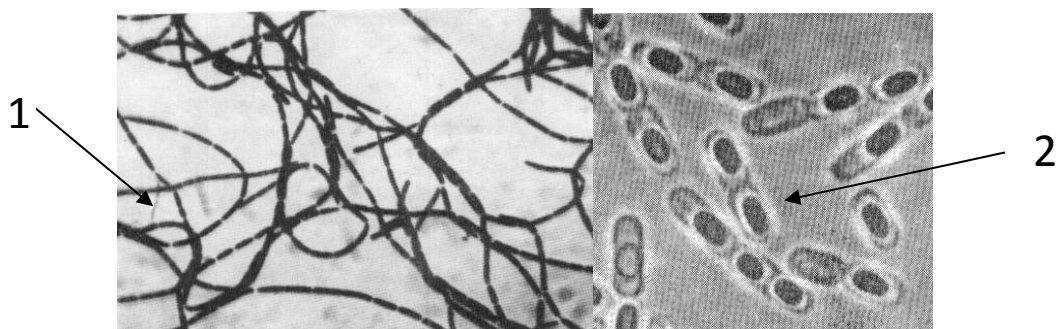
Частицу налета пересевают в новую пробирку с конденсационной водой. Эту процедуру повторяют пока не изолируется чистая культура.



**Рисунок 4 – Морфология клеток бактерий рода *Proteus***

### **Использование терморезистентности для получения мезофильных бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus***

Для получения накопительной культуры *Bacillus subtilis* 10 г сена измельчают, заливают водой (100 г) и кипятят в течение 10 мин. Затем культивируют в термостате при 20–30 °С в течение 2–3 дней. На поверхности суспензии вырастает серо-белая пленка из палочек *B.subtilis* (рисунок 5).



**Рисунок 5 – Морфология клеток и спорных бактерий рода *Bacillus***

**1- цепочка клеток; 2 – спора в клетке**

Через 1, 2, 3 суток, наблюдают различные стадии развития сенной палочки: стадию молодых подвижных клеток; стадию зооглеи; спорообразование (спороносные клетки и зрелые высыпавшиеся споры).

*Bacillus mesentericus* – картофельная палочка. Для получения накопительной культуры истертый в кашу картофель помещают в пробирку или колбу, прогревают на водяной бане при 100 °С в течение 30 мин и оставляют стоять. На картофеле образуется плотная морщинистая пленка, состоящая из палочек *B.mesentericus*.

#### **Методы создания анаэробных условий**

Учитывая, что свободный молекулярный кислород является токсичным для облигатно-анаэробных бактерий, обязательным условием культивирования таких микроорганизмов является ограничение его доступа. Существует ряд методов (механических, физических, биологических), которые позволяют это обеспечить.

#### **Физические методы.**

1.. Перед посевом бактерий на питательную среду его обязательно регенерируют для удаления избытка растворенного кислорода. С этой целью среду кипятят в течение 15-20 мин на водяной бане, а затем быстро охлаждают к необходимой температуре.

2. Для предупреждения проникновения кислорода в среду его заливают слоем стерильного вазелинового масла или парафином.

3. Столбик питательной среды в пробирках должен быть достаточно высоким (10-12 см). Кислород, как правило, диффундирует в толщу столбика на глубину до 2 см, потому ниже создаются благоприятные условия для культивирования анаэробных микробов.

4. Эвакуационно-заместительный метод заключается в использовании анаэроустатов. Они представляют собой герметические металлические или пластмассовые банки, из которых можно выкачать кислород и заменить его инертным газом (гелий, азот, аргон). Допускается использование трехкомпонентной газовой смеси, которая состоит из 80 % азота, 10 % диоксида углерода и 10 % водорода. Допустимым считается использование

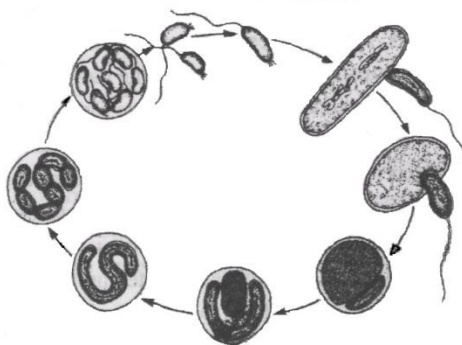
природного газа. Для поглощения кислорода, который остается в анаэроостате, используют палладиевые катализаторы. С целью поглощения водяного пара используют хлорид кальция, силикагель и т. п., которые помещают на дно анаэроостата.

### **Биологические методы получения накопительных культур бактерий**

Биологические методы выделения культур микроорганизмов основаны на использовании специфических хозяев для выделяемого микроорганизма, а также культуры тканей (клеток) хозяев. Ряд биологических методов основан на преимуществе патогенных свойств выделяемых микроорганизмов (например, его инвазивность), которыми не обладают другие представители смешанной популяции.

#### **Бактериальный паразитизм**

Типичным представителем паразитов бактерий является аэробный вибрион *Bdellovibrio bacteriovorus*. Клетки этих паразитов относительно малы и очень подвижны благодаря толстому (50 нм) жгутику, они способны, натываясь на бактерию-хозяина, прикрепляться к ее клеточной стенке противоположным месту расположения жгутика концом. Иногда паразит вращается вокруг продольной оси, проникая через клеточную стенку бактерий. Пораженная клетка округляется, превращаясь в подобие сферопласта. Размножение *Bdellovibrio bacteriovorus* происходит в периплазматическом пространстве. Там клетка паразита растет в длину до тех пор, пока не будут израсходованы питательные вещества, извлекаемые из уменьшающегося протопласта хозяина. Затем происходит множественное поперечное деление, при котором образуется несколько клеток равной величины. Клетка хозяина растворяется, а потомство бактерии-паразита освобождается в активном состоянии (рисунок 6).



**Рисунок 6 – Цикл развития *Bdellovibrio bacteriovorus* в бактерии-хозяине**

Метод выделения бделловибрионов во многих отношениях сходен с методом, используемым для бактериофагов. По мере размножения и распространения паразитов лизис бактерий становится макроскопически заметным: на бактериальном газоне появляются зоны лизиса, или "дырки", а в суспензиях уменьшается светорассеяние. В отличие от бактериофагов, которые размножаются только в растущих клетках, *Bdellovibrio* поражает и лизирует также и нерастущие клетки. Штаммы *Bdellovibrio*, выделенные из различных почв, различаются кругом своих хозяев. Они лизируют в основном грамотрицательных бактерий, предпочитая псевдомонад и энтеробактерий.

### **Симбиоз бактерий рода *Rhizobium* с растениями**

Симбиоз различных видов клубеньковых бактерий с клетками бобовых растений в корневых клубеньках относится к наиболее дифференцированным симбиотическим взаимоотношениям. Клубеньки на корнях растений представляют собой природную накопительную систему симбиотических азотфиксирующих бактерий рода *Rhizobium*. Клубеньки часто окрашены в розовый цвет за счет присутствия в покровной ткани леггемоглобина.

Бактерии легко выделяются из клубеньков бобовых растений, собранных в период их вегетативной активности. При взаимодействии с растениями они образуют инфекционные структуры, которые проникают в ткань корня, вызывают ее разрастание и образуют инволюционные формы клеток – бактериоиды.

### **Получение чистых культур *Staphylococcus pneumoniae* методом заражения лабораторных животных**

Патогенный микроорганизм можно выделить, инокулируя животное-хозяина смешанной культурой, в которой он находится. В инфицированном животном патогенный микроб преобладает и часто обнаруживается в виде чистой культуры в крови и тканях. При этом в результате действия защитных механизмов животного рост непатогенных сопутствующих микроорганизмов ингибируется или они гибнут.

Чистую культуру пневмококков можно получить через 4–6 ч после внутрибрюшного введения мыши 1 мл эмульгированной мокроты, содержащей *Staphylococcus pneumoniae* и другие бактерии. Пробы перитонеальной жидкости берут из брюшной полости животного с помощью стерильной остроконечной капиллярной пипетки.

### **Биологические методы совместного культивирования (сокультивирования) продуцентов.**

1. Метод Фортнера. Метод заключается в совместном культивировании на одной среде аэробных и анаэробных микроорганизмов. Сначала по диаметру чашки вырезают полоску агару шириной до 0,5-1,0 см. С одной стороны засевают исследуемый материал, который содержит анаэробные

возбудители, а из другого – микробы, которые являются индикатором анаэробных условий (*Serratia marcescens* или “чудесная палочка”). Края чашки парафинируют или закрывают пластилином. Через некоторое время на поверхности среды вырастают колонии как аэробных, так и анаэробных микробов. При поглощении кислорода *Serratia marcescens* дает рост бледно-розовых или бесцветных колоний, а при нарушениях герметичности – ярко-красные. На другой половине чашки вырастают колонии анаэробных микробов.

2. Метод Хеннеля (“часовых стекол”). Он является своеобразной модификацией предыдущего. Материал, который содержит анаэробные возбудители, засеивается на поверхность питательной среды диаметром 2-2,5 см. Сверху он покрывается “часовым стеклом”, заполненным слоем МПА и засеянным *Serratia marcescens*. Аэробные микроорганизмы, поглощая кислород, создают условия для благоприятного роста анаэробных возбудителей. В высоко специализированных лабораториях пользуются специальной анаэробной техникой, которая включает использование питательных сред без кислорода с обновителями, выполнение посевов и пересевов в атмосфере инертных газов, углекислоты и тому подобное.

## **ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ**

Для поддержания культур микроорганизмов в жизнеспособном состоянии, а также поддержания таксономически важных признаков и свойств разработаны специальные методы, включающие создание специальных питательных сред и условий хранения. Основная проблема длительного хранения сводится к созданию условий анабиоз – торможения процессов обмена веществ. Культуры микроорганизмов сохраняют в специальных коллекциях типовых культур.

В крупных коллекциях имеются банки бактерий, мицелиальных и дрожжевых грибов, вирусов, культур тканей растений и животных. В настоящее время в различных странах насчитывается свыше 500 коллекций. Жизнеспособность микроорганизмов поддерживается следующими методами: 1) периодическими пересевами на свежие питательные среды; 2) хранением в условиях низких и ультранизких температур; 3) лиофилизацией; 4) высушиванием; 5) хранением под минеральным маслом.

### **Периодические пересевы (субкультивирование)**

Периодические пересевы – наиболее традиционный, исторически сложившийся метод поддержания культур микроорганизмов. Со времен Л. Пастера и Р. Коха и до настоящего времени этот метод широко используется в различных лабораториях и является главным для микроорганизмов, не выдерживающих замораживания или высушивания.

Пересевы аспорогенных культур микроорганизмов проводят на свежие питательные среды с интервалом один-два раза в месяц (иногда еженедельно, если это необходимо), культуры спорообразующих бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов пересевают через два-три месяца. Время

инкубирования до начала хранения не должно превышать периода экспоненциального роста культуры. Как правило, культуры, находящиеся в начале стационарной фазы роста, лучше переносят условия хранения. Частые пересевы, особенно на жидкие питательные среды, вызывают изменения свойств, способствуют возникновению спонтанных мутантов, которые могут при более высокой скорости роста вытеснять исходную популяцию. Кроме того, при изменении свойств у мутантов они могут снижать активность продукции биологически активных соединений в сравнении с исходной культурой. Поэтому для хранения следует использовать генетически однородную популяцию на плотной питательной среде (если они на ней растут). Для предотвращения возможных изменений в популяции лучше приготовить серию субкультур, полученных из одной родительской культуры. Микроорганизмы между пересевами хранят в темноте при температуре от плюс 5 до плюс 20 °С.

Преимуществом метода периодических пересевов являются простота и удобный визуальный контроль чистоты культуры, а также возможной визуальной морфологической изменчивости колоний (образование R и S вариантов, пигментных, секторных и других колоний). Недостатками метода считаются: возможность заражения, краткосрочность хранения, трудоемкость работы и расход в больших количествах компонентов питательных сред.

В качестве примера можно привести молочнокислые бактерии, характеризующиеся высокими требованиями к условиям культивирования. Во время периодических пересевов они часто утрачивают свои ценные производственные свойства. Известно, что актиномицеты и мицелиальные грибы при частых пересевах на богатые питательные среды также могут изменять свойства, снижать или утрачивать способность к образованию антибиотических веществ, спор. Некоторые пигментообразующие бактерии (виды рода *Azotobacter* и др.) при пересевах утрачивают способность образования пигментов. Методом периодических пересевов в коллекциях обычно поддерживают ряд бактерий, дрожжи, мицелиальные грибы, простейшие.

### **Хранение микроорганизмов при низких и ультранизких температурах**

Для длительного хранения бактерий, вирусов (включая бактериофагов), мицелиальных грибов, дрожжевых грибов, водорослей и простейших используют низкие и ультранизкие температуры. Изучением возможности хранения того или иного вида микроорганизмов при низких и ультранизких температурах занимается наука «криобиология».

Обычно культуру микроорганизмов готовят в виде густой суспензии с титром  $10^8$ – $10^{12}$  клеток/мл в криозащитной среде, предохраняющей клетки от повреждений, а затем помещают в стеклянные или пластиковые ампулы или пробирки с завинчивающимися пробками. Известно, что густая суспензия при различных стрессах повреждается в меньшей степени, чем популяция низкой плотности. В качестве криогенов используют смесь льда или снега (3

г) с NaCl (1 г), имеющую температуру минус 21 °С или смесь льда (2 г) с CaCl<sub>2</sub> (1 г), имеющую температуру минус 56 °С. Используют также твердую углекислоту, имеющую температуру минус 78 °С. Замораживание клеток проводят в сосудах Дюара.

Микроорганизмы замораживают в рефрижираторах при температуре от минус 12 до минус 80 °С. В последние годы для хранения микроорганизмов в крупных коллекциях используют рефрижираторы с азотом: газовой-фазовый (минус 130–170 °С) и жидко-фазовый (минус 196 °С) рефрижираторы емкостью от 10 до 35 л. В жидком азоте хранятся микроорганизмы, не выдерживающие лиофилизации (автотрофы, спирохеты, микоплазмы), а также вирусы. Лучше всего сохраняют стабильность в жидком азоте закваски молочнокислых бактерий, а также тест-культуры бактерий и дрожжей, используемые для определения витаминов и оценке антибиотической активности.

Сохранение жизнеспособности микроорганизмов при замораживании и оттаивании зависит от природы микроорганизма, возраста и плотности популяции, условий культивирования, криопротекторов, скорости замораживания–оттаивания и других факторов.

Установлено, что даже штаммы одного вида могут отличаться чувствительностью к низким температурам. Грамположительные бактерии обычно более устойчивы к замораживанию, чем грамотрицательные. Для любого вида хранения микроорганизмы выращивают при оптимальных условиях до начала стационарной фазы. При периодическом культивировании микроорганизмы обычно более чувствительны к холоду в экспоненциальной фазе роста. Споры более устойчивы к замораживанию, чем вегетативные клетки.

Микроорганизмы, выращенные на синтетической среде, обычно более чувствительны к действию различных стрессов, чем клетки, полученные на богатой питательной среде, содержащей сложные компоненты. Изменяя состав среды, можно подобрать условия, способствующие синтезу в клетках таких соединений, как гликогенподобные резервные вещества, липиды, пептиды, которые защищают их от повреждений при замораживании–оттаивании.

При замораживании микроорганизмов в солевом растворе или бульоне они быстро погибают, в воде – умеренно, а в глицерине или молоке сохраняют свою способность длительный период времени. Было выявлено хорошее криопротекторное действие ряда веществ. В настоящее время в качестве криопротекторов применяют как низкомолекулярные соединения (10–20%-ный глицерин, 7–10%-ный диметилсульфоксид, 10–20%-ная сахароза), так и высокомолекулярные (белки, 10 %-ный поливинилпирролидон). Их условно подразделяют на две группы: 1) вещества, проникающие в клетки (глицерин, диметилсульфоксид); 2) вещества, не проникающие в клетки (поливинилпирролидон).

Механизм криозащитного действия этих веществ окончательно не выяснен. Предполагается, что криопротекторы уменьшают концентрацию

электролитов, противодействуют осмотическому давлению, изменяют структуру воды вне клеток, действуют на поверхность и проницаемость клеток.

Относительно объяснения повреждений клеток при замораживании предложено много теорий. Согласно ранней теории образование кристаллов льда внутри клеток вызывает механическое повреждение мембран и последующую гибель клеток. Другая популярная теория объясняет повреждение клеток как следствие увеличивающейся концентрации в них солей при быстром удалении воды в процессе образования льда вне- и внутриклеточно. Концентрация внутриклеточных растворов вызывает изменение рН и увеличение скорости реакций между компонентами даже при очень низкой температуре, что приводит к денатурации таких макромолекул, как белки, ДНК и РНК, и к нарушению клеточных мембран.

В настоящее время признается, что повреждения клеток могут возникать в зависимости от скорости охлаждения. При медленной скорости охлаждения, когда внутриклеточная вода не замерзает, происходит дегидратация клеток и увеличивается концентрация солевых растворов, которые ответственны за их повреждения. При средней скорости охлаждения (до минус 20 °С или ниже) около 90 % внутриклеточной воды замерзает, остальные 10 % составляет «связанная» вода. При высоких скоростях охлаждения образуются внутриклеточные кристаллы льда, вызывающие повреждения и гибель клеток. Видимо, существует связь между величиной кристаллов льда и выживаемостью микроорганизмов.

Полагают, что при быстром охлаждении в мембранах образуются гидрофильные каналы, через которые происходит утечка из клеток веществ. При медленном охлаждении липидные цепочки перестраиваются и препятствуют образованию таких каналов. Оптимальной скоростью охлаждения считается та, при которой клетки подвергаются наименьшим повреждениям.

В последние годы большое внимание исследователи уделяют влиянию скорости замораживания и оттаивания на жизнеспособность клеток. Различают скорость охлаждения до точки замерзания суспензии и скорость охлаждения от точки замерзания суспензии. Лучшие результаты выживаемости получены при двухэтапном режиме охлаждения: сначала с медленной скоростью охлаждения (1 °С/мин) до минус 30 °С и затем охлаждением со скоростью 15–30 °С/мин до минус 150 °С. Ампулы хранят в жидком азоте при минус 190 °С.

Следует подчеркнуть, что необходимо измерять скорость охлаждения образца, а не охлаждающей бани. Скорость оттаивания образца должна быть быстрой. Особенно это имеет значение в случае быстрого и ультрабыстрого охлаждения для предупреждения повреждений, вызываемых рекристаллизацией льда. Обычно образец оттаивают в водяной бане при плюс 30–45 °С.

Преимущества метода криогенного хранения культур состоит в следующем: малая вероятность заражения культуры, сохранения

стабильности свойств микроорганизмов, затрате небольшого времени и небольшого количества материалов при подготовке культуры к хранению. Клетки можно легко извлечь из рефрижиратора и использовать в качестве прямого инокулята. Трудности метода: требует специального оборудованного рефрижиратора и регулярного контроля его работы, мер предосторожности при проверке герметичности стеклянных ампул для предупреждения взрыва.

### **Лиофилизация**

Большое значение как наиболее перспективный приобрел метод лиофилизации (freeze-drying), заключающийся в высушивании клеток из замороженного состояния под вакуумом, минуя жидкую фазу (по типу сублимации).

Впервые этот метод был применен для гистологических исследований в 1890 году. В настоящее время лиофилизация широко используется для хранения культур длительный период (более 30 лет) в крупных коллекциях. Этим методом можно сохранять грамположительных и грамотрицательных бактерий, актиномицетов, микоплазм, микромицетов, дрожжей. В процессе лиофилизации микроорганизмы подвергаются действию различных стрессов: замораживание, высушивание, дегидратации и др. Важным аспектом является установление причин, вызывающих повреждение клеток при лиофилизации, а также подбор условий, обеспечивающих сохранение жизнеспособности и стабильности признаков.

Выживаемость лиофилизированных микроорганизмов зависит от специфической чувствительности вида и штамма, стадии роста культур, концентрации клеток, состава защитных сред, режима лиофилизации, условий хранения (температура, газовая атмосфера, свет), условий реактивации (состав и показатель активности воды -  $a_w$  среды, продолжительность хранения).

Особо важное значение имеет состав защитных или суспензионных сред, в которых лиофилизируют клетки. В первых работах бактерии лиофилизировали в бульоне или молоке, фактически используя их в качестве защитных сред. Микроорганизмы, лиофилизированные в дистиллированной воде или физиологическом растворе, имели низкую выживаемость и плохо сохранялись. Защитные среды для различных видов микроорганизмов подбирали эмпирически.

Установлено, что протекторными свойствами обладают сложные вещества: сыворотка крови, белки сыворотки, желатина, молоко, мясной бульон, декстрин, крахмал, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, пептон. Защитный эффект на микроорганизмы оказывают и простые вещества: глюкоза, сахароза, галактоза, глутамат натрия, аспарагинат натрия и некоторые другие. Наиболее часто применяются сложные среды: 1 % желатина + 10 % сахарозы; обезжиренное молоко + 7 % глюкозы; 75 % лошадиной сыворотки + 25 % бульона + 7,5 % глюкозы; 2 % декстрина + 0,5 % аскорбиновой кислоты; телячья сыворотка + 5 % мезо-инозита; 10 %

сухого молочного порошка + 1 % глутамата натрия. Лучший результат получается при использовании одновременно двух-трех защитных сред.

Существуют различные гипотезы о механизме действия защитных сред. Первая: защитная среда должна содержать вещество, способное сохранять остаточную влажность до определенного уровня; минимальное количество электролитов; вещество, формирующее механический каркас (матрицу), на котором высушиваются микроорганизмы. Вторая: механизм защиты клеток часто связывают с физико-химическими факторами. Низкомолекулярные соединения (сахара), проникая в клетку, создают большое осмотическое давление, растворяют метаболиты и препятствуют разрыву клеточной оболочки во время высушивания. Высокомолекулярные белки и другие полимеры не проникают внутрь клетки и заставляют клеточную оболочку плотнее прилегать к цитоплазме при регидратации клеток. 3. Протекторные свойства отдельных соединений тесно связаны с их химической структурой: с наличием трех или более водородных связей и ионизирующих групп в подходящей конформации, у глутаминовой кислоты и аргинина – с  $\text{NH}_2$ -группой, а у сахаров и полиспиртов – присутствием более пяти  $\text{OH}$ -групп. Предполагается, что протекторные растворы стабилизируют клеточные структуры вблизи клеточной мембраны.

Для лиофилизации используют различные аппараты и режимы. Например, лиофилизация в центробежно-сублимационном аппарате с дальнейшим досушиванием в сублимационном аппарате. Для чего концентрированную суспензию микроорганизмов ( $10^9$ – $10^{10}$  клеток/мл) в защитной среде (снятое молоко + 5 % лактозы + 5 % сахарозы) разливают по 0,2 мл в ампулы из нейтрального стекла. Ампулы охлаждают до минус 20–24 °С с одновременным высушиванием при температуре сублиматора 20, 26 °С, рефрижиратора – минус 45, минус 60 °С при вакууме  $1 \cdot 10^{-3}$  (0,11–0,07 мм рт.ст.). Длительность замораживания–высушивания составляет 5–6 ч, досушивания – 2 ч. Ампулы запаивают под вакуумом и хранят при 4 °С в темноте.

Лиофилизированные клетки лучше сохраняются под вакуумом или в атмосфере инертного газа (аргон, неон, гелий, криптон), чем на воздухе. Кислород оказывает токсическое действие; его эффект коррелирует с образованием свободных радикалов и (или) с повреждением клеточной мембраны. Лиофилизированные культуры лучше хранить при температуре 4–6 °С. Многими работами показано, что с увеличением температуры хранения от 18 до 37 °С число жизнеспособных клеток уменьшается.

На жизнеспособность клеток и скорость их отмирания при хранении оказывает влияние количество воды, оставшейся непосредственно после лиофилизации. Оптимум остаточной влажности (2–6 %) варьирует в зависимости от состава среды, в которой микроорганизмы высушивали, атмосферы хранения, а также от вида и физиологического состояния микроорганизмов. Сверхвысушивание (ниже 0,5–1,5 % влажности) является губительным. Лиофилизированные клетки, как правило, необходимо хранить в темноте; при хранении на свету выживаемость их резко падает.

Большое значение придается процессу реактивации – выведению лиофилизированных клеток из состояния анабиоза. Условия, снижающие возникающий при вскрытии ампул осмотический шок и стресс, увеличивают процент выживаемых клеток. Хорошие результаты получены при медленном добавлении дистиллированной или водопроводной воды (0,2–1,0 мл) к сухим клеткам. В качестве регидратантов применяют мясной бульон, пептон, растворы органических кислот и питательные среды. В некоторых коллекциях лиофилизированные бактерии регидратируют в питательном бульоне в течение 10 мин, а грибы – в водопроводной воде в течение 15–20 мин.

Микроорганизмы, поврежденные в процессе замораживания-высушивания, хранения и регидратации, отличаются повышенной чувствительностью к среде реактивации и лучше всего восстанавливают свои свойства при культивировании на богатых естественных средах после нескольких пассажей.

Наиболее часто при лиофилизации повреждаются клеточные стенки, клеточные мембраны и РНК. После регидратации поврежденные клетки сначала восстанавливают свою измененную проницаемость, а затем начинают синтезировать РНК и белки. Эти репарационные процессы заканчиваются в период начала репликации ДНК. Лيوфилизированные клетки имеют удлиненную лаг-фазу роста, но она сокращается после внесения в среду культивирования растворов пептида и аминокислот.

Результаты многочисленных исследований показывают, что лиофилизация является надежным способом сохранения жизнеспособности у большого числа видов микроорганизмов и стабильности важных признаков у тех видов, которые выдерживают этот процесс на протяжении многих лет хранения. Однако известны факты изменения структуры и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов в результате замораживания-высушивания. Отмечается уменьшение величины и изменение морфологии лиофилизированных клеток, у отдельных штаммов микроорганизмов происходит задержка скорости роста и пигментообразования, снижение антибиотической активности. Но некоторые штаммы после регидратации отличаются повышением биохимической активности (азотфиксации, скорости поглощения кислорода).

### **Хранение микроорганизмов в высушенном состоянии**

Процесс высушивания – простейший метод хранения микроорганизмов. Многие микроорганизмы хорошо переносят длительное воздушное высушивание в природе (в почве, песке, глине и т.д.) и в различных пищевых продуктах, на растительных и животных остатках. В процессе высушивания происходит обезвоживание микробных клеток. В живых клетках вода составляет 80–90 % микробной массы. Во время высушивания клетки теряют свободную воду и рост микроорганизмов прекращается при остаточной влажности 10–12 %. При снижении остаточной влажности до 2–5 % сохраняется прочно связанная с клеточными структурами вода, которая строго локализована. В высушенных таким

образом клетках биохимические реакции приостанавливаются или отдельные реакции протекают очень медленно.

Резистентность микроорганизмов к высушиванию зависит от многих факторов: свойств микроорганизмов, среды и условий культивирования, методов высушивания, остаточной влажности, условий хранения и реактивации. Процесс высушивания лучше всего переносят спорообразующие виды. Эндоспоры, цисты, конидии, артрспоры, вероятно, возникли у микроорганизмов в процессе эволюции для перенесения неблагоприятных условий окружающей среды. Эндоспоры бактерий отличаются наибольшей устойчивостью к высушиванию: от 60 до 300 лет и это, вероятно, не предел. Механизм резистентности спор к высушиванию до конца остается необъясненным. Большинство исследователей придерживаются точки зрения, что резистентность является результатом низкого содержания воды в цитоплазме спор.

Как правило, аспорогенные микроорганизмы, особенно морские и пресноводные, быстро погибают при высушивании. Однако патогенные стрептококки и стафилококки отличаются высокой устойчивостью к высушиванию. Это имеет большое биологическое значение в связи с переносом инфекционных заболеваний. Хорошо переносят длительное пребывание в высушенной почве клубеньковые бактерии, также не образующие спор.

Высушивание культур микроорганизмов проводят на различных сорбентах: в стерильной почве, песке, глине, силикагеле, на пшене, фильтровальной бумаге, вате, стеклянных и фарфоровых бусах, тканях, пластмассах, нерастворимом фосфате, углекислом кальции, крахмале, кристаллах сахарозы и т.д. Причины лучшего сохранения микроорганизмов на сорбентах пока неясны. По-видимому, сорбенты защищают микроорганизмы от сильного высыхания и поддерживают определенный уровень влажности.

Ряд микроорганизмов, не выдерживающих лиофилизации, переносят высушивание под вакуумом на сухих таблетках пептона, крахмала, декстрана, а также на бумажных, целлофановых или желатиновых дисках. В производственной практике широко применяют методы контактной (с адсорбентом) и конвективной (в сухом воздухе) сушки для хранения хлебопекарных и кормовых дрожжей, заквасок молочнокислых бактерий, бактериальных удобрений, энтомопатогенных препаратов.

Процесс реактивации микроорганизмов из высушенного состояния включает: увлажнение клеток (регидратация), ликвидация поврежденных клеточных структур (репарация) и восстановление численности популяции путем размножения жизнеспособных клеток. Высушивание приводит к удлинению лаг-фазы роста и поэтому для восстановления скорости размножения требуется определенное время. Процесс реактивации обычно лучше происходит в полноценной питательной среде.

Существует зависимость между температурой хранения высушенных клеток, рН и  $a_w$  среды. Величина  $a_w$  имеет большое значение в связи с

вопросами выживаемости и размножения микроорганизмов при термической обработке пищевых продуктов. Методы высушивания благодаря своей простоте нашли широкое применение в лабораториях и в практике. Высушенные культуры микроорганизмов легко хранить и транспортировать.

### **Хранение культур под минеральным маслом**

Метод хранения под минеральным маслом применяется для сохранения крупных коллекций и в условиях лабораторий. Он отличается простотой, не требует специальной аппаратуры и обеспечивает относительно длительное сохранение жизнеспособных клеток и стабильности признаков. Впервые для сохранения культур гонококков применили вазелиновое масло в 1914 году. Принцип метода заключается в следующем: культуру микроорганизмов выращивают на благоприятной питательной среде и заливают стерильным вазелиновым маслом (слоем 0,5–1,0 см). В таких условиях в клетках замедляется скорость обменных процессов и предотвращается поверхность среды от высыхания.

Аэробные микроорганизмы выращивают в пробирках на поверхности коротко скошенной среды (под углом 45°). Микроорганизмы, растущие в анаэробных условиях, сеют уколом в столбик агаризованной питательной среды. Молочнокислые и некоторые светящиеся бактерии культивируют в полужидкой питательной среде с 0,25–0,40 % агара. При определении срока заливки культур маслом следует учитывать способность их к образованию покоящихся форм (эндоспор, цист). Аспорогенные микроорганизмы лучше заливать маслом в начале стационарной фазы роста, спорообразующие – в стадии формирования спор, актиномицеты и мицелиальные грибы в возрасте 7–14, а дрожжевые – 12–14 суток.

Для хранения применяют высокоочищенное медицинское вазелиновое масло (плотность 0,8–0,9), которое предварительно стерилизуют в автоклаве (давление  $1 \cdot 10^4$  Па), а затем прогревают для удаления воды в сушильном шкафу при температуре не выше 150 °С или выдерживают при комнатной температуре 2–3 суток. Масло наливают не выше 1 см над верхним краем среды. Более тонкий слой масла не предохраняет среды от высыхания. Культуры микроорганизмов хранят при 5 °С или при комнатной температуре в темноте.

При пересеве избыток масла удаляют прикосновением петли к внутренней стенке пробирки. Капли масла на поверхности питательной среды снижают скорость роста культур в первом пассировании. Для определения числа жизнеспособных клеток масло оттягивают пипеткой, содержимое пробирки переносят в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды и делают посев на плотную агаровую среду из серии разведений.

Во время длительного хранения идет процесс отмирания клеток, поэтому чувствительные микроорганизмы, как правило, пересевают из-под масла один-два раза в год. Большинство видов дрожжевых и мицелиальных грибов пересевают один раз в год, а мицелиальные грибы – каждые два-три года.

Признаки микроорганизмов после относительно длительного хранения под маслом остаются большей частью стабильными. Но иногда хранение под маслом вызывает задержку роста микроорганизмов и снижает скорость использования ими питательных субстратов. Через два-три пассажа на питательной среде того же состава, на которой хранится культура, скорость роста и ферментативная активность восстанавливаются. У некоторых мицелиальных грибов после хранения под маслом обнаружены признаки утраты спороношения, уменьшения скорости роста, образования секторных колоний.

Хранение под маслом имеет следующие преимущества: обеспечивает длительное сохранение стабильности свойств большинства микроорганизмов; сокращает время, необходимое для приготовления сред и пересевов; из одной пробирки можно отбирать инокулят несколько раз.

К недостаткам метода следует отнести возможность инфицирования лаборатории и работающего персонала из-за разбрызгивания масла при обжигании петли. Поэтому во время работы следует соблюдать необходимые меры предосторожности. Требуется также время для очистки от масла использованной посуды.

Итак, для хранения культур микроорганизмов могут быть использованы различные методы. Некоторые микроорганизмы целесообразно хранить только в одних условиях, тогда как другие при возможности выбора нескольких предпочтительно сохранять в условиях, обеспечивающих максимальную выжи-ваемость. Для гарантии длительного поддержания стабильной культуры рекомендуется одновременно хранить микроорганизмы различными методами.

Для определения сохранности живых микроорганизмов различными методами общепринято использовать в качестве критерия подсчет их колоний, выросших после предварительных разведений на богатых питательных средах или только констатировать факт роста на соответствующей жидкой или плотной питательной среде. Процент выживаемости микроорганизмов определяют по отношению числа сохранившихся клеток к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100%. Процент поврежденных клеток вычисляют по разнице между общим числом клеток на богатой питательной среде и числом клеток, выросших на синтетической («минимальной») среде определенного химического состава.

# РАЗДЕЛ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

## Лекция № 2

### Тема: Методы и возможности генетической инженерии в создании продуцентов

#### План

1. Исторические предпосылки развития генетической инженерии
2. Общие принципы и методы генетической инженерии
3. Ферменты генетической инженерии.
4. Векторные молекулы ДНК

Основные усилия для использования биологического агента в биотехнологических процессах направлены на улучшение его генетических свойств. Традиционно для этой цели использовали способы мутагенеза с последующим скринингом продуцентов. Сегодня в этой области произошли громадные перемены. В настоящее время используются принципиально новые методы, основанные на технологии рекомбинантных ДНК. Модификация генетического материала осуществляется разными методами: в живом организме (*in vivo*) и вне его (*in vitro*) соответственно, эти два направления – клеточная и генетическая инженерия.

С помощью этих методов возможно получение новых высокопродуктивных продуцентов белка и пептидов человека, антигенов, вирусов, плазмидных векторов, космид, фазмид и т.д. Фундаментом для возникновения новейших методов биотехнологии послужили открытия в генетике, молекулярной биологии, генетической энзимологии, вирусологии, микробиологии, электроники.

#### Генетическая инженерия и ее роль в биотехнологии.

Важнейшим этапом для развития биотехнологии было выделение в самостоятельную науку молекулярной биологии в середине прошлого столетия. В этот период Э.Чаргофф и З.Д. Хочкис открыли правило, названное правилом Чаргаффа о том, что соотношение пуриновых и пиримидиновых оснований одинаково у всех видов. Открыта генетика бактериофагов, процессы переноса генетического материала фагами (трансдукция). Хейсом в этот период был открыт процесс конъюгации у бактерий. Дж. Уотсон и Ф. Крик в 1953 г. предложили комплементарную молекулу ДНК и описали процесс репликации. Г. Гамов в 1954 г. выдвинул гипотезу генетического кода, которая была подтверждена в 1961 г.

Следующим этапом развития было расшифровывание процессов транскрипции и трансляции. Сформулирован принцип передачи наследственной информации: **ДНК-РНК-белок**, который был назван центральной догмой молекулярной биологии. Следующим огромным достижением была расшифровка генетического кода (1954 г), который сделал Г.А. Гамов, Крик и другие.

На долгие годы захватил умы генетиков и мол. биологов гипотеза **оперонного принципа** организации генов, открытая в 1961 году Жакобом и Моно. В 1962 г. Гердон доказал, что информация во всех клетках в ядрах одинаковая на мальках и здоровых клетках лягушки.

В 1969 г. в США Г. Хорана с сотрудниками впервые синтезировал ген химическим путем. П. Робертс и П. Шарп установили, что гены состоят из многих частей, кодирующих – экзонов и некодирующих – интронов. Открыли явление сплайсинга.

Новая революция в генетике произошла в середине 70-х годов. Она также была результатом синтеза знаний нескольких наук. Но на этот раз объединились знания генетиков из различных направлений: молекулярной, химической генетики, генетики бактериофагов, бактерий, плазмид, млекопитающих и др. Возникла технология манипулирования генетическим аппаратом, которая была названа генетическая инженерия.

В 1978 г. впервые были созданы **геномные библиотеки** – наборы фрагментов ДНК, заключенные в тот или иной вектор (плазмиду или фаг) и в соокупности представляющие весь геном конкретного вида животных, растений или других организмов. Несколько позже в 1985 году Р. Саики и К. Мюллес предложили другой способ клонирования генов – метод полимерной цепной реакции генов (ПЦР), позволяющий синтезировать необходимые фрагменты ДНК и затем увеличивать число их копий. Метод уже широко используется не только в молек. Биологии, но и других областях.

В конце 70-х гг. получила завершение теория открытия мобильных элементов генома (**МЭГ**). Кроме теоретических знаний это свойство генома может быть использовано для трансформации генетического аппарата полезных живых организмов.

Не менее важным открытием является расшифровка генома с помощью так называемого **секвенирования** (разделения на фрагменты) ДНК хромосом. Это открытие методом разделения позволяет определять последовательность нуклеотидов в ДНК. В 1972 году Берг с сотрудниками создали первую рекомбинантную ДНК, состоящую из фрагмента ДНК вируса ОВ-40 и бактериофага  $\lambda$ dvgal с галактозным опероном *E.coli*. Инструментом для генетического конструирования стали группы ферментов – реструктурирующие нуклеазы (рестриктазы) и лигазы. Первые необходимы для

получения однородных фрагментов ДНК, вторые – для их соединения. Рестриктазы и лигазы в совокупности с ферментами нуклеазами, обратной транскриптазой и ДНК-полимеразой обеспечивают проведение всех генноинженерных манипуляций.

В 1977 г впервые была прочитана последовательность нуклеотидов в ф-фаге. В наст. время используют этот метод. 1995 г. – сиквенс бактерий *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium*. 1997 г. – *Escherichia coli*, *S. cerevisiae*. 1999 г. – нематода и дрозофила. В 200 г. и 2001 г. секвенирован и расшифрован геном человека.

Особую известность получили исследования по **клонированию** животных и растений. Эти работы были начаты русским ученым Г.В. Лопашевым еще в 1940 году. Он осуществил первые ядерные пересадки ядер в некоторые безъядерные клетки. Затем работы были прекращены из-за запрета генетики в Советском Союзе. В 1997 г. группой английских ученых на клетках животных была создана с помощью трансплантации ядра всемирно известная овца Долли, в 1999 г. ученые США клонировали мышь и корову. В марте 2000 г. на свет появилось пять клонированных поросят.

Генетическая инженерия – это новый раздел экспериментальной молекулярной биологии. Генетическая инженерия значительно расширила экспериментальные границы молекулярной биологии, поскольку позволила вводить в клетку чужеродную ДНК. Данный подход открыл перспективы создания принципиально новых микробных продуцентов биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих функционально активные чужеродные гены. Более того, появилась возможность искусственно создавать гены, кодирующие химерные полипептиды, обладающие свойствами двух или более природных белков. Все это дало мощный импульс развитию биотехнологии.

### **1.1 Общие принципы и методы генетической инженерии**

Чем принципиально отличается генная инженерия от классической селекции? В отличие от генных инженеров, селекционеры при получении новых сортов растений, пород животных или рас микроорганизмов сталкиваются со следующими ограничениями.

1. нельзя скрещивать неродственные виды
2. нельзя управлять процессом рекомбинации в организме
3. нельзя предугадать, какое получится потомство

Технологии, возникшие на основе методов молекулярной генетики, используются в самых разнообразных областях, таких как диагностирование наследственных заболеваний у человека и животных, криминалистике и

этнографии, производство биологически активных веществ. Трансгенных растений и животных с заданными свойствами, клонирование целых организмов.

Генетическая инженерия – это целенаправленное конструирование молекулярных генных систем – рекомбинантных ДНК *in vitro* с последующим их введением в живой организм. Преимущества рекомбинантной техники перед обычными генетическими методами – в ее специфичности и в способности к более глубокому и направленному изменению генома клетки. В геном клетки возможно ввести целые серии новых, в том числе биологически отдаленных генов, удалить или заменить уже существующие, то есть можно конструировать штаммы с заданными свойствами организма. Организму можно придать новые свойства, изменить физиологию, изменить дозу гена.

Основным объектом манипуляций генной инженерии служит ген – фрагмент ДНК, являющийся функциональной единицей наследственности, кодирующий определенный белок. Ген не имеет системы сигналов, обеспечивающей его действие в клетке. Это компенсируется присоединением гена к вектору – циклической молекуле ДНК, содержащей сигналы репликации и транскрипции. Репликация – способность самовоспроизведения ДНК, транскрипция – считывание с молекулы ДНК матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), соответствующей определенному гену. Трансляция самой белковой молекулы осуществляется уже на матричной РНК.

Процесс конструирования рекомбинантных ДНК включает:

1. представление о молекулярном функционировании генов, подлежащих клонированию.
2. способы выделения генов из живых объектов или их химического синтеза.
3. возможность сшить нужные гены в нужной последовательности с выполнением правил, обеспечивающих эффективную экспрессию (транскрипцию (перепись) и трансляцию (передача)).

методы введения рекомбинантных ДНК в реципиентный организм и создание соответствующих условий, при которых рекомбинантная ДНК стабильно сохранялась и функционировала в организме продолжительное время. В результате изолированный ген из генома приобретает способность функционировать в реципиентной клетке. Сочетание генов и векторов дает рекомбинантную молекулу ДНК. После введения в реципиентную клетку рекомбинантная ДНК становится составной частью ее генетического аппарата и придает ей новые генетические, биохимические и физиологические свойства. Прикладная генная инженерия конструирует

рекомбинантные ДНК, которые могли придать клеткам или микроферментам полезные для человека свойства. Например, способность синтезировать вещества, необходимые для медицины (вакцины, гормоны, инсулин, интерферон), синтезировать пищевой и кормовой белок, утилизировать ксенобиотики (гербициды, пестициды).

### **Ферменты генетической инженерии**

Осуществить рекомбинацию молекул ДНК стало возможным лишь после открытия в начале 1970-х гг. ряда новых ферментов, имеющих в качестве катализируемых ими реакций нуклеиновые кислоты. Ферменты. Используемые в инженерных целях делятся на рестриктазы, ДНК-лигазы и ДНК-полимеразы.

К рестриктазам относят ферменты, способные осуществлять разрезание молекул ДНК в специфических сайтах рестрикции. Рестриктазы необычайно широко распространены в мире микроорганизмов. В свою очередь их подразделяют на три класса: рестриктазы I, рестриктазы II и рестриктазы III.

Рестриктазы класса I выделены из клеток *E.coli*. Они содержат три типа неидентичных субъединиц и специфичны к немодифицированной двухцепочечной ДНК, в качестве кофакторов используют АТФ. Рестриктаза класса I III. после взаимодействия с ДНК в участке узнавания начинает осуществлять АТФ-зависимую транслокацию цепей ДНК через себя в обоих направлениях. При встрече двух соседних молекул фермента, транслоцирующих ДНК, они разрезают двухцепочечную молекулу ДНК в районе контакта.

Рестриктазы класса II – относятся просто организованные белки, состоящие из двух субъединиц одного типа. Они узнают и разрезают немодифицированную молекулу ДНК по специфическим нуклеотидным последовательностям, и это приводит к образованию дискретного набора фрагментов анализируемой ДНК. Для специфического действия этих ферментов требуются только ионы  $Mg^{2+}$ .

Рестриктазы класса III состоят из двух субъединиц и обладают рестриктирующей и метилазной активностью. Эти рестриктазы узнают несимметричные последовательности длиной 5-6 пн и расщепляют ДНК в стороне от участков узнавания на расстоянии 27-28 пн, образуя одноцепочечные ДНК. Для проявления эндонуклеазной активности требуются АТФ и ионы  $Mg^{2+}$ .

Следующий тип ферментов, использующийся в генетической инженерии - ДНК-лигазы. Эти ферменты способны осуществлять сшивку двухцепочечных молекул ДНК по месту разрыва и существуют в двух

разновидностях. Наиболее приемлемым для конструирования ДНК является ДНК-лигаза фага Т4, которая обеспечивает ковалентное соединение любых двухцепочечных фрагментов ДНК.

Третий тип ферментов - ДНК-полимераза I – была обнаружена в 1958 г и является первой найденной полимеразой. Имеет трехдоменную структуру, причем каждый домен обладает отдельной ферментативной активностью. ДНК-полимераза связывается с одноцепочечными участками двойной спирали ДНК, в местах одноцепочечных разрывов, а также с концами двухцепочечных молекул ДНК. Обладает 5<sup>1</sup> - 3<sup>1</sup> полимеразной активностью, для реакции необходимо наличие комплементарного фрагмента – праймера. 3<sup>1</sup> - 5<sup>1</sup> - экзонуклеазной активностью, и 5<sup>1</sup> - 3<sup>1</sup> экзонуклеазной активностью.

И, наконец, последний тип ферментов – обратная транскриптаза. Она была обнаружена при изучении ретровирусов, геном которых представлен молекулами одноцепочечной РНК. В процессе внутриклеточного развития эти вирусы проходят стадию интеграции своего генома в виде двухцепочечной ДНК в молекуле клетки-хозяина. Этот вирус имеет специфичный фермент – обратную транскриптазу, способную синтезировать на РНК-матрице комплементарную ДНК. Обратную транскриптазу преимущественно используют для транскрипции матричной РНК в комплементарную ДНК. Полученную ДНК можно затем встраивать в клонирующие векторы, размножать в составе гибридных молекул ДНК и использовать для дальнейших исследований.

### **1.3 Векторные молекулы ДНК**

В 1972 г. П. Берг с сотрудниками впервые сообщили о получении гибридной молекулы, состоящей из ДНК вируса и ДНК фага. При этом использовался метод, получивший название коннекторного. Коннекторный метод позволяет получить рекомбинированные фрагменты ДНК, полученные любым из способов расщепления исходной ДНК (механическим, ферментативным).

Более простой и массовой популярный метод получения гибридных молекул ДНК – рестриктазно-лигазный. Первые гибридные молекулы ДНК получили этим методом С. Коэн с сотрудниками. Данный метод состоит в следующем

1. рестриктазой класса II специфично разрезают молекулы ДНК на фрагменты, имеющие идентичные взаимокплементарные липкие концы;
2. препараты различных молекул ДНК, гидролизованных одной и той же рестриктазой смешивают, и при определенных условиях липкие концы фрагментов ДНК реассоциируют за счет комплементарного взаимодействия;
3. с помощью ДНК-лигазы происходит ковалентное связывание ассоциирование фрагментов ДНК

Новая модификация этого метода основана на использовании линкерных молекул – синтетических сегментов ДНК, содержащих в своем составе последовательности, узнаваемые рестриктазами. Метод предложили Р.Шеллер с сотрудниками в 1977 г. Рестриктазно-лигазный метод, по сравнению с коннекторным методом, находит более широкое применение в генно-инженерных манипуляциях, поскольку он более прост биохимически и, кроме того, дает возможность легко выщепить встроенный фрагмент из гибридной молекулы ДНК, что часто бывает важно при переносе фрагмента в другое генетическое окружение.

Рассмотренные методы позволяют достаточно легко осуществлять рекомбинацию любых фрагментов ДНК. При выделении чистой культуры из колонии, выросшей из единичной клетки, которая содержит индивидуальную молекулу гибридной ДНК, осуществляется клонирование определенного фрагмента ДНК. При этом фрагмент, обеспечивающий репликацию гибридной молекулы ДНК в клетке, называется клонирующим вектором. Такой вектор обладает следующими свойствами: иметь ограниченное число мест расщепления определенной рестриктазой; содержать генетический маркер, который может быть использован для отбора клонов, несущих гибридные ДНК, после введения в чувствительные клетки смеси молекул ДНК, полученных в процессе рекомбинации; не должен терять репликативные функции при встройке экзогенного фрагмента ДНК.

В качестве векторных молекул в генетической инженерии используют широкий спектр плазмидных и вирусных ДНК. Наиболее популярны клонирующие векторы, несущие несколько генетических маркеров, по которым можно легко отличить исходную векторную молекулу ДНК от получаемых гибридов, и имеющие по одному месту действия для нескольких рестриктаз. Кроме того, обычно желательно, чтобы вектор обеспечивал эффективную репликацию гибридных ДНК, так как часто важно иметь в клетке повышенное число копий клонированных генов. Частным случаем клонирующих векторов являются экспрессирующие векторы. Это молекулярные векторы, которые наряду с амплификацией обеспечивают правильную и эффективную экспрессию чужеродных генов в клетках-реципиентах.

В ряде случаев молекулярные векторы могут обеспечивать интеграцию чужеродной ДНК в геном клетки или вируса. Такие молекулы ДНК называются интегративными векторами. Векторные молекулы играют важнейшую роль на этапе клонирования изучаемых последовательностей ДНК. Разработка и совершенствование экспрессирующих векторов позволяет

все с большей определенностью создавать штаммы – суперпродуценты чужеродных белков.

Схема манипуляций генной инженерии включает следующие этапы:

- получение фрагментов ДНК.
- создание вектора.
- введение ДНК в клетку хозяина.

С момента введения рекомбинантной ДНК в клетку начинается молекулярное клонирование, то есть получение потомков созданной рекомбинантной ДНК.

Ключевой операцией генной инженерии является введение в клетку генетической информации и стабильное поддержание ее в клетке. Это достигается при помощи векторов. При обычном попадании ДНК в микробную клетку происходит ее разложение внутриклеточными нуклеазами (рис.1). Векторные молекулы ДНК после введения в клетку способны к автономному существованию как самостоятельной мини-хромосомы и при последующем делении клетки реплицируются и стабильно поддерживаются. Вектор несет генетический признак, необходимый для отбора тех клеток, которые стали носителями вектора.

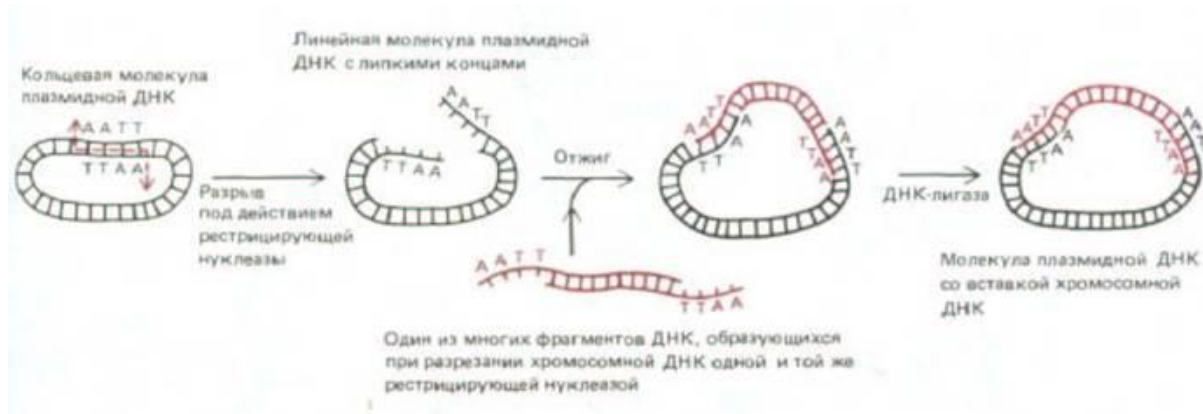


Рис 1. Внедрение плазмидного вектора в ДНК-хозяина

Рекомбинантная ДНК обладает свойствами вектора и способна стабильно сохраняться в клетке, и способна модифицировать генетические клетки.

Наиболее распространенными векторами являются многокопийные плазмиды, обеспечивающие экспрессию включенных в них генов (изменение генов). Плазмиды – это кольцевые молекулы ДНК, которые стабильно передаются потомству клеток независимой ДНК. Молекулярная масса плазмид составляет от  $1 \cdot 10^6$  до  $200 \cdot 10^6$ .

### Лекция № 3

**Тема: Элементы, слагающие биотехнологический процесс: аппаратура и продукты биотехнологии**

## План

1. Характеристика основных типов аппаратов: простые и сложные конструкции.
2. Аппараты для глубинной аэрированной ферментации.
3. Классификация продуктов биотехнологического процесса.

**Аппаратура.** Вопросами технического обеспечения биотехнологических процессов занимается биоинженерия. Для различных процессов существует огромное разнообразие аппаратуры: собственно для процесса ферментации, а также для выделения и получения готового продукта. Наиболее сложна и специфична аппаратура для ферментационной стадии. Технически наиболее сложным процессом ферментации является аэробный глубинный стерильный и непрерывный (или с подпиткой субстратом). Аппараты для поверхностной и анаэробной ферментации менее сложны и энергоемки. В современной литературе описаны сотни биореакторов, отличающихся по конструкции, принципу работы и размерам (от нескольких литров до нескольких тысяч кубометров). Многочисленность методов культивирования, чрезвычайное многообразие используемых биологических агентов привели к огромному разнообразию конструктивных решений, которые зависят от ряда факторов: типа продуцента и среды, технологии и масштабов производства, а также целевого продукта и пр.

Техническое оснащение биотехнологии базируется на общих положениях технической биохимии и пищевой технологии, однако имеет свою специфику. Принципиальное отличие биотехнологических процессов от чисто химических заключается в следующем: чувствительность биологических агентов к физико-механическим воздействиям; – наличие межфазового переноса веществ (по типу «жидкость – клетки», «газ – жидкость – клетки»);

- требования условий асептики;
- низкие скорости протекания многих процессов в целом;
- нестабильность целевых продуктов;
- пенообразование;
- сложность механизмов регуляции роста и биосинтеза.

Аппараты для анаэробных процессов достаточно просты и применяются в процессах конверсии растительного сырья, в том числе растительных отходов, а также различных промышленных отходов. При метановом брожении для получения биогаза, а также в ряде других процессов (получение ацетона, шампанских вин) используют

ферментационные аппараты (метанотенки). Эти аппараты имеют различную конструкцию (от простой выгребной ямы до сложных металлических конструкций или железобетонных сооружений) и объемы (от нескольких до сотен кубометров. Метановые установки оборудованы системой подачи сырья, системой теплообмена труб для стабилизации температуры, несложным перемешивающим устройством для гомогенного распределения сырья и биомассы продуцента, газовым колпаком и устройством переменного объема (газгольдер) для сбора образуемого биогаза. Конструкция аппаратов для аэробной ферментации определяется типом ферментации и сырья.

Аппараты для аэробной поверхностной ферментации, широко применяемые для производства органических кислот и ферментов, достаточно просты по конструкции и, соответственно, подразделяются на жидкофазные и твердофазные. Поверхностная жидкофазная ферментация протекает в так называемых бродильных вентилируемых камерах, в которых на стеллажах размещены плоские металлические кюветы. В кюветы наливают жидкую питательную среду, высота слоя составляет 80–150 мм, затем с потоком подаваемого воздуха среду инокулируют спорами продуцента. В камере стабилизируется влажность, температура и скорость подачи воздуха. После завершения процесса культуральная жидкость сливается из кювет через вмонтированные в днища штуцера и поступает на обработку.

При **твердофазной ферментации** процесс также протекает в вентилируемых камерах, но вместо кювет на стеллажах размещают лотки, в которые насыпают сыпучую твердую среду слоем 10–15 мм. Для лучшей аэрации среды подаваемый в камеру воздух проходит через перфорированное днище лотков.

Аппараты для **аэробной глубинной** ферментации наиболее сложны как конструктивно, так и с точки зрения их эксплуатации. Главная задача, возникающая при их конструировании, – обеспечение высокой интенсивности массо- и энергообмена клеток со средой. Массообмен определяется транспортом (переносом) кислорода и других биогенных элементов из среды в микробную клетку и отводом из нее продуктов обмена. Главным показателем массообменных характеристик ферментера служит коэффициент массопередачи кислорода, так как кислород является основным лимитирующим фактором аэробных ферментационных процессов.

Расход кислорода на образование 1 кг биомассы в зависимости от типа углеродсодержащего сырья и степени его восстановленности может составлять от 0.75 до 5.00 кг. Клетки способны утилизировать кислород

только в растворенном виде, поэтому необходимо постоянно поддерживать его концентрацию в культуре на уровне, оптимальном для конкретного продуцента. При этом скорость поступления кислорода к клеткам должна превышать скорость его включения в клетки, и в околоклеточном пространстве не должно возникать так называемых «концентрационных ям». Кроме этого, концентрация клеток и растворенного субстрата должны быть равномерными по всему объему ферментера. Поэтому перемешивание является также одним из основных факторов, обеспечивающих требуемую гидродинамическую обстановку в аппарате. При интенсивном перемешивании пузырьки воздуха дробятся в аппарате и диспергируясь увеличивают площадь контакта фаз «среда-клетка». Однако чрезмерное перемешивание может вызвать механическое повреждение биологических объектов.

К настоящему времени разработано и применяется огромное количество разнообразнейших перемешивающих и аэрирующих устройств, и классифицировать их практически невозможно. Наиболее удачна, по нашему мнению, попытка классификации ферментационных аппаратов для аэробной глубинной ферментации по подводу энергии (Виестур и др., 1986; 1987). Согласно этой классификации, аппараты такого типа делятся на три группы по подводу энергии: 1) – к газовой фазе, 2) – к жидкой фазе, 3) – комбинированный подвод.

**Ферментеры с подводом энергии к газовой фазе (группа ФГ).** Их общий признак – подвод энергии в аппарат через газовую фазу, которая является ее носителем. Ферментеры характеризуются достаточно простой конструкцией (отсутствуют трущиеся, движущиеся узлы), высокой эксплуатационной надежностью, но имеют не очень высокие массообменные характеристики (коэффициент массопередачи кислорода менее  $4 \text{ кг/м}^3$ ) (рис. 1.6). Данные аппараты представляют собой вертикальную емкость, снабженную газораспределительным устройством одного из известных типов.

**Барботажные** газораспределительные устройства обычно устанавливаются в нижней части аппарата. Подаваемый сверху через распределительную трубу воздух, пройдя через барботер, насыщает кислородом толщу среды. Коэффициент массопереноса кислорода невысок,  $1\text{--}2 \text{ кг/м}^3 \text{ ч}$ ; барботажно-колонный – в нижней части корпуса такого аппарата устанавливается перфорированная пластина с диаметром отверстий  $0.0005 \text{ м}$  или сопловой эжектор с диаметром сопла  $0.004 \text{ м}$ ; **барботажно-эрлифтный** аппарат характеризуется наличием внутри одного или нескольких диффузоров («стаканов») или нескольких перегородок для принудительного разделения восходящих и нисходящих потоков циркулирующей жидкости; эти элементы

расположены равномерно по сечению аппарата или концентрично; **газлифтный колонный ферментер** состоит из двух колонн разного диаметра, соединенных между собой; одна представляет собой барботажную колонну с восходящим потоком воздуха, другая – циркуляционная, с нисходящим потоком. Воздух вводится в нижнюю зону аппарата в барботажную колонну; камера, соединяющая колонны в верхней части аппарата, образует большую поверхность контакта фаз; **трубчатый аппарат** сконструирован по типу теплообменных труб; взаимодействие газа в трубе при высоких скоростях продувки более интенсивное, чем в большом объеме, поэтому массообмен интенсивнее; аппарат с плавающей насадкой позволяет интенсифицировать массообмен за счет увеличения поверхности контакта фаз и турбулизации жидкости при работе с большими скоростями подачи газовой и жидкой фаз. В аппарат введены секционные элементы в виде решеток, оборудованных лопастной насадкой; в центре аппарата находится труба, через которую вводится воздух, а жидкая фаза поступает противотоком сверху. Газ, поступая на лопастную насадку, обычно из полиэтилена, вращает ее; это существенно увеличивает поверхность контакта газовой и жидкой фаз.

**Ферментеры с вводом энергии жидкой фазой (группа ФЖ)** наиболее сложны по конструкции и энергоемки, но обеспечивают наиболее высокие по сравнению с группой ферментеров ГФ значения коэффициента массопередачи кислорода, свыше  $6 \text{ кг/м}^3 \text{ ч}$ . В данных аппаратах ввод энергии осуществляется жидкой фазой, обычно самовсасывающими мешалками или насосами; в последнем варианте жидкость вводится в аппарат через специальное устройство (сопло, эжектор, диспергатор). Данные аппараты также можно подразделить на ряд типов (рис. 1.7): ферментеры с **самовсасывающими мешалками** не требуют специальных воздуходувных машин, так как поступление в них воздуха происходит в результате разрежения в воздушной камере мешалки, соединенной с воздухопроводом и с жидкостью, отбрасываемой лопатками мешалки; в **эжекционных ферментерах** возможна рециркуляция газовой фазы, что экономит субстрат, однако требуется наличие специальных насосов для перекачки газосодержащей культуральной среды. Применение эжекционного ввода газовых субстратов в ферментер может интенсифицировать массообмен на порядок; **струйные ферментеры** (с затопленной или падающей струей) оборудуются мощными насосами, которые забирают культуральную жидкость из нижней части аппарата и через напорный трубопровод подводят поток к аэрирующему устройству (по типу шахтного перепада или напорнотруйные).

Струя жидкости под давлением свободно падает сверху и пронизывает эрируемую жидкость до дна аппарата. Происходят интенсивные турбулизация и перемешивание жидкости. Внизу жидкость вновь засасывается насосом и снова подается вверх аппарата, то есть возникает замкнутый контур циркуляции. Недостатком данных аппаратов являются потери энергии при перекачке жидкости, трудности проектирования в связи с отсутствием надежных методик расчета конструкций и режимов работы струйных и эжекционных устройств.

Третья группа аппаратов – с подводом энергии газовой и жидкой фазами (группа ФЖГ). Основными их конструкционными элементами являются перемешивающие устройства всех известных типов, а также наличие в совокупности насосов и перемешивающих устройств. Это могут быть аппараты с группой самовсасывающих мешалок и насосом для перекачивания культуральной жидкости и другие сочетания перемешивающих и аэрирующих устройств. Коэффициент массопереноса кислорода в таких ферментерах может в принципе иметь любые из известных значения.

Перечисленные типы аппаратов возникли в основном в течение «эры» антибиотиков и белка одноклеточных и применяются, главным образом, в технической микробиологии. Прогресс в области получения клеточных и рекомбинантных культур выдвигает специальные требования к биореакторам. При этом на первый план выдвигаются такие показатели, как стабильность биологических агентов, повышенные требования к асептике, лимитация срезовых условий при перемешивании и др. Однако, многие из таких конструкций пока еще носят экспериментальный характер.

**Продукты.** Ассортимент продуктов, получаемых в биотехнологических процессах, чрезвычайно широк. По разнообразию и объемам производства на первом месте стоят продукты, получаемые в процессах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов. Эти продукты подразделяются на три основные группы:

1 группа – биомасса, которая является целевым продуктом (белок одноклеточных) или используется в качестве биологического агента (биометаногенез, бактериальное выщелачивание металлов);

2 группа – первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микроорганизмов в качестве строительных блоков макромолекул, коферментов (аминокислоты, витамины, органические кислоты);

3 группа – вторичные метаболиты (идиолиты) – это соединения, не требующиеся для роста микроорганизмов и не связанные с их ростом (антибиотики, алкалоиды, гормоны роста и токсины).

Среди продуктов микробиологического синтеза – огромное количество различных биологически активных соединений, в том числе белковых и лекарственных веществ, ферментов, а также энергоносители (биогаз, спирты) и минеральные ресурсы (металлы), средства для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур (биоинсектициды) и биоудобрения. В связи с развитием новейших методов биотехнологии (инженерной энзимологии, клеточной и генной инженерии) спектр целевых продуктов непрерывно дополняется. Среди них все большее место занимают средства диагностики и лечения (гибридомы, моноклональные антитела, вакцины и сыворотки, гормоны, модифицированные антибиотики).

## ЛЕКЦИЯ 4

### **Тема: Кинетические параметры биотехнологических процессов. Контроль и управление.**

#### **План**

1. Критерии оценки эффективности биотехнологических процессов.
2. Показатели биотехнологических процессов.
3. Параметры управления биотехнологическими процессами.

По сравнению с химическими биотехнологические процессы должны быть более технологичными, экономичными и экологичными, либо вообще должны исключать альтернативы. Оценка альтернативности вариантов (химические или биотехнологические) только через себестоимость продукта – односторонняя. Для оценки эффективности биотехнологий, помимо качества получаемого продукта, могут быть другие условия, например:

- Сопоставление экспериментального и теоретического выхода продукта, рассчитанные по материально-энергетическому балансу процесса.
- Затраты и стоимость сырья в крупномасштабных биотехнологических процессах, как правило, являются определяющими, поэтому материально-энергетическая оценка очень существенна.

При использовании процессов на основе высокопродуктивных рекомбинантных штаммов-продуцентов основная доля затрат относится не к сырью, а к созданию продуцента и его поддержанию, а также разработке

специальных условий его культивирования, то есть в данном случае экономика сырьевых и энергоресурсов играют второстепенную роль.

В биотехнологическом процессе главная роль - биологическому агенту. Эффективность биотехнологических процессов зависит от природы и физиолого-технологических свойств биологического агента. Для роста биообъекта нужны:

- исходный жизнеспособный посевной материал,
- источники энергии и углерода, питательные вещества для синтеза биомассы,
- отсутствие действия ингибиторов роста,
- физико-химические условия ферментации (рН, температура, аэрация и др.).

### **Скорость роста продуцента**

Это основной показатель биотехнологических процессов: он характеризует адекватность условий ферментации. Скорость роста – увеличение биомассы организмов с бинарным делением в хорошо перемешиваемой среде – пропорциональна концентрации микробной биомассы:

$$dX/dt = \mu X,$$

где  $dX/dt$  – скорость роста,

$X$  – биомасса,

$\mu$  – коэффициент пропорциональности, («удельная скорость роста»);

Этот параметр аналогичен сложным процентам (например, если удельная скорость роста равна  $0.1 \text{ ч}^{-1}$ , – значит увеличение биомассы равно 10 % в час).

### **Удельная скорость роста продуцента**

Величина  $\mu$  постоянна, как это бывает в установившемся режиме культивирования, при интегрировании уравнение имеет вид:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t,$$

где  $X_0$  – биомасса в начальный период времени  $t$ .

График зависимости  $\ln X$  от времени будет иметь вид прямой линии с наклоном  $\mu$ . Удельная скорость роста является одним из основных параметров, характеризующих физиологическое состояние продуцента;

Ряд других параметров может быть выражен через этот показатель.

### **Продуктивность процесса**

Это количество продукта, получаемого на единицу объема биореактора в единицу времени. Продуктивность процесса зависит от многих факторов:

- активности продуцента,
- значений коэффициента выхода продукта из потребленного субстрата,
- количества активной биомассы в ферментере:

$$P = q_s Y_p/s X \text{ [г/л ч.]},$$

где  $q_s$  – скорость потребления субстрата (метаболический коэффициент),

$Y_p/s$  - выход продукта (экономический коэффициент),  
 $X$  – концентрация биомассы,  
 $P$  – продуктивность,  $s$  – субстрат.

### **Выход продукта (Y) (экономический коэффициент)**

Определяется как количество продукта, получаемого из данного количества:

$$Y = X / S_0 - S,$$

где  $S$  и  $S_0$  – конечная и исходная концентрация субстрата.

Данный коэффициент выражает эффективность использования субстрата для получения целевого продукта и является очень важной характеристикой и непосредственно связан с продуктивностью и позволяет влиять на себестоимость конечного продукта. Экономический коэффициент можно выражать и в процентах (%).

Экономический коэффициент имеет четкий физический смысл, характеризует степень перехода энергии, заключенной в субстрате, в продукт. Величина – экономический коэффициент – необходима для расчетов и прогнозирования процесса в целом и используется в качестве параметра для контроля и управления ходом различных процессов и сопоставления их эффективности.

### **Конечная концентрация продукта. Удельные энергозатраты**

Концентрация продукта выражается в массе (кг, т, г/объем, в процентах от субстрата) и должна планироваться с учетом продолжительности процесса и величины выхода продукта. Достижение конечной высокой концентрации продукта – цель – и оправдана, даже когда выделение, концентрирование его трудоемки и дорогостоящи.

Удельные энергозатраты (затраты на единицу продукта) существенно варьируют в зависимости от направленности и схемы процесса ферментации, условий подготовки сырья на предферментационной стадии и постферментационных процедур. Удельные энергозатраты очень существенно зависят от типа ферментационного оборудования.

### **Непродуктивные затраты субстрата (h)**

Это затраты энергии субстрата, которые не проявляются в приросте продукта. В общем виде они выражаются через экономический коэффициент:

$$h = Y_{\text{экспериментальный}} / Y_{\text{теоретический}} < 1.$$

Они существенно влияют на эффективность и экономику биотехнологического процесса. Непродуктивные затраты субстрата могут быть связаны с ошибками при считывании генетической информации в ходе быстрого роста продуцента и затратами на поддержание при разобщенном росте в результате снижения эффективности образования энергии, из-за

возрастания трат энергии на поддержание жизни без размножения (транспорт субстратов и мономеров в клетке, ресинтез молекул, защитные реакции, процессы репарации).

## **КОНТРОЛЬ И УПРАВЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ**

До середины XX века регулирование в основном сводилось к эмпирике, без знания сущности происходящего невозможно эффективно контролировать и управлять процессом. Главным объектом управления того периода была экстенсивная периодическая культура микроорганизмов со всеми ее недостатками: динамикой состояния продуцента и среды, отсутствием средств контроля.

Параметры управления биотехнологическими процессами изменяются в зависимости от развития научно-технического прогресса человечества. В последние 30 лет: внедрены управляемые культуры в биотехнологии. Это достигается путем:

- перехода от простой задачи поддержания определенных параметров среды к управлению процессом в целом.
- Использованием для реализации управляемого культивирования с помощью алгоритмов управления, основанных на моделях биотехнологического процесса.

В современных биотехнологических процессах регистрируют и анализируют множество быстроизменяющихся факторов:

- концентрацию субстрата,
- биомассы продуцента и продукта в культуре,
- рН,
- температуру,
- парциальное давление кислорода, углекислого газа, водорода и др.),
- скорость перемешивания,
- освещенность.

Обычная схема контроля и управления ферментацией включает :

- ферментер,
- датчики, регулирующую систему, которая реализует расчетные зависимости на основе измерения параметров процесса.



**Рисунок 1 – Ферментер с программным управлением**

Исходные данные от датчиков поступают в отдел программного управления, в котором они оперативно анализируются, и в результате выдаются данные для исполнительных устройств и механизмов.

Моделирование - наиболее значимое направление при разработке биотехнологических процессов. С помощью моделирования, экспериментального и математического, исследуются и разрабатываются новые процессы, совершенствуются аппараты и технологические схемы производств. При экспериментальном моделировании в лабораторных и промышленных условиях применяются, модели объектов и процессов, отличающиеся масштабами. Разработка адекватных моделей различных биотехнологических процессов и на их основе создание совершенных методов оптимизации и управления – перспективное направление биотехнологии, без которого невозможен прогресс.

## **Лекция № 6**

### **Тема: Процесс биометаногенеза: биохимические стадии и продуценты План**

1. Характеристика процесса биометаногенеза
2. Микробные ассоциации, участвующие в биометаногенезе
3. Биохимические пути образования метана метаногенными бактериями
4. Технологическая схема получения биогаза одностадийным способом
5. Технологическая схема получения биогаза двухстадийным способом
6. Преимущества процесса микробиологического получения метана

### **Характеристика процесса биометаногенеза**

Проблема поиска альтернативных экологически чистых источников энергии в условиях постоянно растущих темпов добычи, потребления ископаемых видов топлива и от их использования загрязнений становится очевидной. Биомасса, загрязняющая землю в виде отходов промышленности и бытовой переработки – является возобновляемым источником энергии и

весьма перспективным сырьем для получения газообразного топлива. Массовым видом органических остатков являются отходы животноводства и сточные воды городов. Выход животноводства США составляет 250 млн. тонн/год, переработка которых может дать около 113 млрд.м<sup>3</sup> метана в год. Подсчитано, что анаэробная переработка навоза от 400 голов крупного рогатого скота обеспечит топливом поселок из 300 домов. Кроме того, она обеспечивает минерализацию азота, углерода и фосфора - основных элементов органических удобрений.

Биогаз образуется в ходе анаэробного дыхания или биометаногенеза. Впервые этот процесс был открыт в 1776 году Вольтой. Образующийся биогаз состоит на две трети из метана и одну треть углекислоты, обладает высокой теплотой сгорания – от 21 до 33,5 кДж/м<sup>3</sup> в зависимости от относительного содержания метана. Концентрация метана в биогазе определяется химическим составом перерабатываемого субстрата: чем больше восстановлен субстрат, тем выше концентрация метана. 1 м<sup>3</sup> биогаза эквивалентен 4 кВтВчас электроэнергии.

Биометаногенез протекает в три этапа: гидролиз органических соединений, ацидогенез, метаногенез. В сложных процессах биометаногенеза участвуют микробные ассоциации, включающие от нескольких до нескольких десятков видов.

#### *Микробные ассоциации, участвующие в биометаногенезе*

Разложение высокомолекулярных органических соединений осуществляют анаэробные бактерии, синтезирующие гидролазы. Целлюлозу разлагают представители родов *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Cellobacterium*, *Bacteroides*, пектин - *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Selenomonas*. Белки разлагают бактерии рода *Bacteroides* *Bifidobacterium* *Selenomonas*, крахмал – *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Selenomonas* и др. На втором этапе метаногенеза из полученных продуктов гидролиза при участии кислотобразующих микроорганизмов формируются различные метаболиты. Состоящие из органических кислот, которые затем микробным сообществом окисляются в основном до ацетата и диоксида углерода. На этой стадии образуются также водород, аммиак, сероводород и спирты.

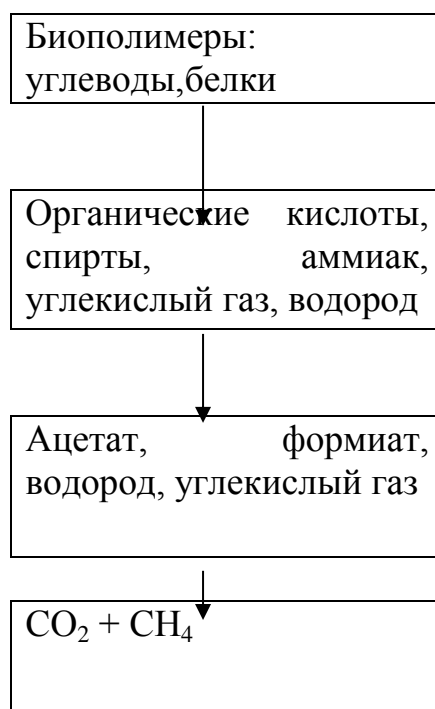
Преобразование продуктов гидролиза биополимеров в смесь кислот (лактат, формиат, ацетат, пропионат) и спиртов (этанол, метанол, пропанол, ацетон) с выделением аммиака, сероводорода, водорода и углекислого газа осуществляют бактерии семейства *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae* (*Clostridium*), *Butyrivibrio*. Кроме этих микроорганизмов в процессах сбраживания принимают участие представители другой микрофлоры, например, анаэробные спирохеты.

Основную роль в образовании уксусной кислоты играют ацедогенные клостридии, способные образовывать ацетат из метанола, этанола, формиата, пропионата, бутирата. *Clostridium thermoaceticum* осуществляет ацетогенез из CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>, а также из CO и H<sub>2</sub>O.



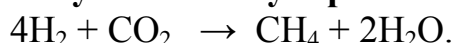


На последнем этапе происходит превращение органических веществ под действием ферментов метаногенных бактерий в метан и диоксид углерода. Итоговая схема образования метана выглядит следующим образом:

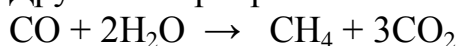


Биохимические пути образования метана метаногенными бактериями

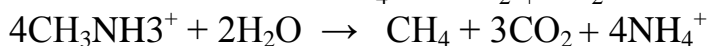
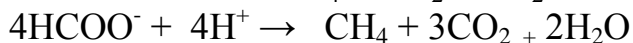
**Метаногенная микрофлора образует метан из различных субстратов. Для большинства известных видов метанобразующих бактерий субстратами служат молекулярный водород и углекислота:**



Другие микроорганизмы синтезируют метан из окиси углерода:



**Известны виды метаногенов, образующих метан из ацетата, формиата, метанола и метиламинов:**



Метанобразующие бактерии относятся к архебактериям. Возраст их оценивают в 3,0-3,5 млрд. лет. От прокариотических эубактерий отличаются отсутствием муреина в клеточной стенке и строении жирных кислот в составе липидов. Различаются специфической последовательностью 16S рРНК, наличием специфических компонентов метаболизма в виде коферментов М (2-меркаптоэтансульфоновая кислота) и кофермента F<sub>420</sub> (деазафлавин) и фактора F<sub>430</sub> (тетрапирол), содержащего никель.

Метаногены делят на три таксономические группы. Все они относятся к 31 группе царства Археобактерий.

А. Палочковидные, ланцетовидные или кокковидные, использующие водород, углекислый газ, формиат или водород с метанолом, клеточная стенка содержит псевдомуреин. Содержит 4 рода (*Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanothermus*).

В. Кокковидные, палочковидные, спиралевидные или пластинковидные организмы, использующие  $H_2 + CO_2$ , формиат или спирты +  $CO_2$ ; клеточные стенки не содержат псевдомуреин и клетки лизируются под действием детергентов, спиралевидные формы имеют чехлы. Содержат 8 родов (*Methanococcus*, *Methanocorpusculum*, *Methanoculleus*, *Methanogenium*, *Methanolacinia*, *Methanomicrobium*, *Methanoplanus*, *Methanospirillum*).

С. Псевдосарцины, кокки или покрытые чехлом палочки, использующие субстрат для роста триметиламин или ацетат. Содержат 6 родов (*Methanococcoides*, *Methanohalobium*, *Methanohalophilus*, *Methanolobus*, *Methanosarcina*, *Methanotherix*).

Как следует из описания, к подгруппе А принадлежность можно определить по морфологии и субстрату катаболизма. Подгруппа В объединяет генетически разнородные организмы, которые часто трудно отнести к соответствующему роду. Для систематизации требуются специальные генетические тесты.

В подгруппу С входят ацетотрофные покрытые чехлом палочки, кокки и псевдосарцины. Среди представителей этой подгруппы имеются галофилы. Используемые только метилсодержащие субстраты.

Получение метана из органических удобрений с помощью микроорганизмов характеризуется высоким выходом энергии. На долю метана приходится до 90 % энергии, содержащейся в исходном субстрате. Теплотворная способность чистого биогаза составляет около  $10^4$  ккал/м<sup>3</sup>.

Технологически образование биогаза происходит в два этапа: 1 – формирование метанового биоценоза; 2 – непрерывная или периодическая ферментация.

Первый этап называют кислотным, так как метанобразующие бактерии растут медленнее, чем ферментативные бактерии, поэтому перед началом образования газа в среде накапливаются летучие жирные кислоты. Потом скорости образования и потребления кислот выравниваются, и далее идут параллельно – разложение субстрата и образование газа.

Микробиология кислотообразующего этапа изучена недостаточно. Исследования микроорганизмов, осуществляющих образование кислот в метантенке, свидетельствует о том, что значительную их часть составляют облигатные анаэробы. Наличие их не исключает одновременно присутствия большого количества факультативных анаэробных бактерий, подобных стрептококкам и кишечным бактериям. Облигатные анаэробы мезофильного типа включают семейства *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*. Важная роль в процессе анаэробного

разложения органических веществ принадлежит неспоровым облигатным анаэробам родов *Bacteroides* и *Butivibrio*.

В течение первого этапа метаногенеза развиваются анаэробные бактерии разнообразных физиологических групп: целлюлозоразрушающие, углеводсбраживающие (типа маслянокислых), аммонифицирующие (разрушающие белки, пептиды и аминокислоты) и др. Благодаря такому сообществу бактерий первичные анаэробы могут использовать разнообразные органические вещества растительного и животного происхождения. В этом и состоит одна из важнейших особенностей бактерий, осуществляющих разложение органических веществ с образованием метана. Тесная связь между указанными группами бактерий обеспечивает достаточную стабильность процесса. Многоступенчатую цепь превращений органических веществ в анаэробных условиях замыкают метаногены.

Метаногены представляют собой уникальную группу бактерий, включающую более 20 видов с совершенно разной формой и структурой клеток. Эту группу бактерий рассматривают как особую ветвь эволюции организмов и называют архебактериями. Метанобразующие организмы объединены в семейства: *Methanobacteriaceae*, *Methanococcaceae*, *Methanomicrobiaceae*, *Metanosarcinaceae*. Для роста метаногенов необходимы только строго анаэробные условия: микроорганизмы могут расти только при отсутствии кислорода при окислительно-восстановительном потенциале ниже 300 мВ.

#### **Условия и технологическая схема получения биогаза одностадийным способом**

Технологически получение биогаза подразделяется на два этапа: созревание метанового биоценоза и ферментация. В течение первого периода развиваются бактерии, участвующие в анаэробном разложении исходных органических веществ и продуктов их распада. В результате их деятельности создаются условия для активного биосинтеза метана. Не смотря на сложность и далеко не полную изученность, такая биологическая система достаточно надежна и проста для получения биогаза в промышленных масштабах.

Образование метана из жидких органических веществ осуществляется в строго анаэробных условиях при 30-40<sup>0</sup> С (мезофильный процесс) или 50-60<sup>0</sup> С (термофильный процесс). Ферментацию проводят в реакторах (метантенках) объемом от одного до нескольких тыс м<sup>3</sup>. Метантенки выполняются из железобетона или металла. Они могут иметь разную форму и конструкцию, от кубической до цилиндрической, расположены горизонтально или вертикально. Лучшей признается яйцеобразная конструкция. Ферментация протекает непрерывно, полупериодически и периодически.

Сырье, содержащее 2-12 % органических веществ, подается в метантенк через теплообменник, где оно подогревается или охлаждается до

температуры ферментации в метантенке. Место введения сырья в реактор и отбора сброженной массы зависит от конструкции метантенка. Реакторы снабжаются мешалками для перемешивания бродящей массы с целью ускорения процессов и теплообменниками для поддержания необходимой температуры внутри реактора. Образующиеся газы удаляются через газовый колпак, расположенный в верхней части метантенка. Газ, содержащий 80-85 % метана и 15-20 %  $\text{CO}_2$ , по газопроводу поступает в газохранилище – газгольдер, откуда подается в газовую сеть.

Скорость процесса определяется температурой ферментации (в термофильных условиях она выше в 2-3 раза, чем в мезофильных), химическим составом сырья, его вязкостью, плотностью бактериальной ассоциации и степенью перемешивания. Ферментация протекает при значениях pH среды, равных 7,0-8,5. При более низком или высоком значении pH она обычно тормозится или прекращается совсем. Снижение величины pH среды («прокисание») связано с нарушением равновесия скоростей образования летучих жирных кислот (муравьиной, уксусной и др) и дальнейшим их превращением, заканчивающимся образованием метана. Подобные дефекты вызываются, как правило, увеличением поступления в реактор легкображиваемых углеводов, а также нарушением соотношения углерода и азота в субстрате. Оптимальные значения лежат в пределах 11-16:1. Повышение значений pH среды (более 8,5) связано либо с высокой концентрацией азотсодержащих органических веществ в субстрате и образованием из них в процессе брожения больших количеств аммония, либо наличием в среде значительных концентраций щелочноземельных металлов. Указанные нарушения процесса обычно устраняются остановкой загрузки ферментера новыми порциями сырья. В результате избыток образовавшихся жирных кислот постепенно конвертируется в метан, pH среды повышается до необходимых оптимальных значений. В некоторых случаях уменьшают объем загрузки сырья в реактор.

Важным моментом промышленной технологии получения метана является скорость поступления сырья в реактор или время выдерживания сырья в реакторе. Указанные параметры зависят прежде всего от скорости конверсии органических веществ в метан. Чем интенсивнее процесс брожения, тем выше скорость загрузки сырья в реактор, меньше время выдерживания сырья в реакторе и рентабельнее процесс. Существующие в настоящее время нормы скорости загрузки сырья находятся в пределах 7-20 % объема субстрата от рабочего объема ферментера в сутки. Следовательно, цикличность процесса равна 5-14 суток. Однако разработаны технологии, в которых цикличность процесса сокращается до 5-15 часов, или скорость загрузки в пределах 150-400 % в сутки.

С большой скоростью происходит образование метана при наличии хорошо растворимых и легко разлагаемых бактериями органических соединений (некоторые виды жидких отходов пищевой, микробиологической и др. отраслей промышленности, перерабатывающих сельскохозяйственное сырье). Медленнее сбраживаются отходы сельскохозяйственного

производства (животноводства и растениеводства), содержащие твердые органические включения.

Широко применяемые в настоящее время в практике метантенки относят к реакторам первого поколения. В них все процессы протекают в одной емкости без деления на стадии и фазы. Бактериальные клетки находятся во взвешенном состоянии и по мере нарастания удаляются вместе со сброженной биомассой. Важным условием нормального функционирования таких реакторов является необходимость поддержания равенства скоростей размножения бактерий и поступления сырья в реактор при условии, что концентрация органического вещества в сырье составляет не менее 2 %. При меньших концентрациях органического вещества плотность бактериальных клеток на единицу объема реактора резко падает, и процесс практически останавливается.

Этот недостаток реакторов первого поколения полностью устраняется при использовании реакторов второго поколения, в которых бактерии при необходимой для процесса плотности находятся в закрепленном (иммобилизованном) состоянии. В реакторах второго поколения можно сбрасывать субстраты с низким содержанием органических соединений (0,5 % сухих веществ) при высокой скорости пропускания через реактор (такие реакторы часто называют «анаэробными фильтрами»).

В качестве носителей для закрепления бактерий широко используется галька, керамические, полихлорвиниловые, полиуретановые кольца и стекловолокно. Применение реакторов второго поколения позволяет резко повысить процессы деструкции и соответственно снизить их объемы, что имеет важное значение при их широком производстве и эксплуатации.

Условия и технологическая схема получения биогаза двухстадийным способом. В последние годы в практику внедряются технологии, основанные на разделении процесса метаногенеза на стадии-фазы: кислотную и метановую. Двухфазный процесс осуществляется в двух реакторах, соединенных последовательно.

Скорость поступления сырья и объемы реакторов рассчитываются так, чтобы в первом протекала только стадия образования кислот, значение рН среды не должно быть выше 6,5. Такая бражка подается во второй реактор, в котором с большой скоростью **протекает** непосредственно образование метана. Двухфазный процесс позволяет увеличить его общую скорость в 2-3 раза.

Иногда в практике при использовании двухфазного процесса с целью дополнительного получения товарного биогаза процесс брожения в первом ферментере проводят при 35-37 °С, во втором – при 55 °С. При нормальных условиях ферментации на каждую тонну сброженного органического вещества образуется до 300-600 м<sup>3</sup> биогаза. Процент разложения органических веществ до метана зависит от скорости процесса и времени выдерживания сырья в реакторе. Обычно эта величина равна 30-60 %.

Концентрация метана в образующемся биогазе зависит от химического состава субстрата: углеводы дают больше углекислого газа, жиры – больше

метана (до 85 %). Чем больше восстановлен субстрат, тем выше концентрация метана.

Метаногенез – процесс эндотермический, требует постоянного подогрева для поддержания необходимой температуры ферментации. Как правило, метантенки и сырье подогреваются за счет сжигания образующегося биогаза. В среднем на поддержание требуемой температуры ферментации расходуется от 15-20 % (мезофильный процесс) до 30-50 % (термофильный процесс) биогаза. Поэтому одним из важных моментов эксплуатации метантенков является хорошая их теплоизоляция.

В последние годы широкое развитие имеет технология твердофазной метангенерации, или получения биогаза при деструкции органических веществ с влажностью 30-40 %. Основное условие их - также анаэробный процесс.

Биогаз кроме метана и углекислого газа может содержать примеси сероводорода (до 2 %), что требует его соответствующей очистки.

#### *Преимущества процесса микробиологического получения метана*

1. Микробиологическое получение метана имеет ряд преимуществ.

Сырьем для получения могут быть разнообразные органические вещества – остатки пищевой промышленности, сельскохозяйственного производства, бытовые стоки, отходы текстильной и деревообрабатывающей промышленности. Почти все они состоят из целлюлозы, легко поддающейся анаэробному разложению с образованием биогаза. Отходы лесной и деревообрабатывающей промышленности содержат лигнин, но при соответствующей предварительной обработке он разлагается с образованием циклических продуктов, которые могут быть использованы бактериями. Выход метана при этом увеличивается на 40 %, на 10 % снижается количество твердых отходов.

2. Более половина углерода ароматических соединений, промежуточных продуктов гидролиза лигнина, может быть превращено в метан с помощью строго анаэробных бактерий. Но для деградации лигнинового комплекса рекомендуют использовать лигнинразрушающие базидиомицеты.

3. Микробиологическое получение метана экономически выгодно даже в случае применения органического материала с малой концентрацией его в воде. Результаты многолетних лабораторных исследований с помощью полупромышленных испытаний показали целесообразность сбрасывания низкоконцентрированных отходов в метантенках, имеющих систему рециркуляции с жестким разделением в верхней части иловой и газовой фаз.

4. Полученный при метановом процессе биогаз легко использовать: он на две трети состоит из метана и одной трети углекислоты, его можно без очистки от углекислого газа применять в народном хозяйстве. Сжатый до 200-250 атм биогаз пригоден в качестве горючего для тракторов, автомашин, а при низком давлении (до 15 % в смеси) – для любой газовой аппаратуры (печей, плиток, котельных).

5. Источник биогаза оказывается вблизи от крупных производств, что

сокращает расходы на транспортировку топлива.

6. Анаэробная переработка отходов животноводства, растениеводства и активного ила помимо накопления биогаза приводит к образованию шлама – органического удобрения. При этом происходит минерализация соединений азота и фосфора главных компонентов и их сохранение в отличие от традиционных способов приготовления органических удобрений методами компостирования. Анаэробная переработка обогащает микробную популяцию анаэробных деструкторов целлюлозы, кислотообразователей, разрушителей лигнина, аммонификаторов. Во время ферментации минерализуется 26-43 % органического вещества. Переработка навоза повышает содержание общего и аммонийного азота на 20-40 %, а фосфора на 50 %.

7. При получении биогаза из органического вещества сточных вод происходит эффективная их очистка (особенно животноводческих и коммунально-бытовых), уничтожаются яйца гельминтов, патогенные микроорганизмы и семена сорняков. Все это вносит существенный вклад в решение крупнейшей экологической проблемы – охраны окружающей среды, а также энергетической проблемы – получения биогаза.

**Заключение.** Таким образом, развитие биотехнологии получения биогаза связано с рядом экономических и экологических проблем. Технология получения биогаза претерпела ряд преобразований. Реакторы первого поколения позволяли получать биогаз с невысоким выходом. Использование реакторов второго поколения, в которых возбудители процесса иммобилизуют на различных носителях, позволило увеличить эффективность технологии. Разработка двухстадийного процесса получения биогаза позволила автоматизировать процесс и ускорить его стадии. Получение биогаза микробиологическим синтезом имеет ряд преимуществ, среди которых наиболее важные – экологичность и экономичность производства.

## **Лекция № 7**

### **Тема: Биотехнология препаратов для агропромышленного комплекса: получение биопестицидов**

#### ***План***

1. Основные направления биотехнологии микробных биомасс биопестицидов.
2. Биопестициды: бактериальные, грибные, вирусные.
3. Биогербициды.
4. Биопрепараты для повышения плодородия почв - биоудобрения.

Биопестициды – пестициды, выделенные или произведенные из объектов природного происхождения (микроорганизмов, растений, животных и минералов).

Для целей регулирования насекомых или болезней группу биопестицидов обычно разделяют на 3 категории:

1. Микробиологические и вирусные препараты на основе микроорганизмов (бактерий, грибов, и простейших) и продуктов их жизнедеятельности.

Более чем 50% в этой группе составляют препараты на основе бактерии *Bacillus thuringiensis*.

2. Препараты из растений, экстрактов из растений и прочих природных субстратов.

*Их пестицидное действие обусловлено наличием в них специфических биологически активных веществ.*

3. Феромоны – препараты на основе природных соединений, не оказывающих токсического действия на вредные организмы, а влияющих только на их поведение.

*Обычно используются в виде приманок и ловушек для вредных насекомых.*

Доля биопестицидов на мировом рынке:  
- пестицидов пока чуть более 2%,  
- рост со скоростью 20%,  
- прогноз: ежегодного объема рынка биопестицидов к 2015 году составляет 2,8 млрд. долларов.

*В развитых странах (ЕС, США, Япония и Южная Корея) на государственном уровне рассматривается возможность перехода сельского хозяйства на альтернативные методы борьбы с вредителями и патогенами, среди которых важное значение имеет использование биопестицидов. В 2002 году принято соглашение (Монреаль) о запрете химических средств защиты растений, приносящих угрозу здоровью и экологии.*

Главными потребителями биопестицидов являются производители органических продуктов питания, организации занимающиеся овощеводством, садовыми культурами и ягодам, а также озеленением населенных пунктов.

Опыт использования микробиологических препаратов в хозяйствах свидетельствует об их положительном влиянии на качество продукции, увеличение урожайности, восстановление почвенной микрофлоры. Россия отстает по всем направлениям биотехнологического производства от лидирующих в этой области стран.

В 1990 году Россия прочно удерживала вторую позицию по уровню микробиологического производства, сегодня общий объем производства сократился с 3-5 % (1995 г.) до 0,3 % (в настоящее время).

Стратегией развития биотехнологической отрасли Российской Федерации до 2020 гг. предусмотрено снижение зависимости от импорта основных видов биопрепаратов, сокращение использования химических средств защиты

растений в 6 раз, массовое создание сельскохозяйственных предприятий, занимающихся органическим земледелием.

Положительно:

Ожидается снижение пестицидной нагрузки на агроценозы и прилегающие территории, что должно положительно отразиться на улучшении общей экологической обстановки.

В настоящее время в России выпускается около 30 наименований микробиологических препаратов для сельского хозяйства, в том числе 11 фунгицидов, 17 инсектицидов. Ими обрабатываются поля на площади около 8 млн. га (9% всех пахотных земель).

*Биопестициды подразделяют по назначению:*

1. Инсектициды (против вредных насекомых)
2. Биофунгициды (против патогенных грибов)
3. Биопестициды против болезнетворных бактерий
4. Нематоциды (препараты против нематод)
5. Биопрепараты против грызунов.

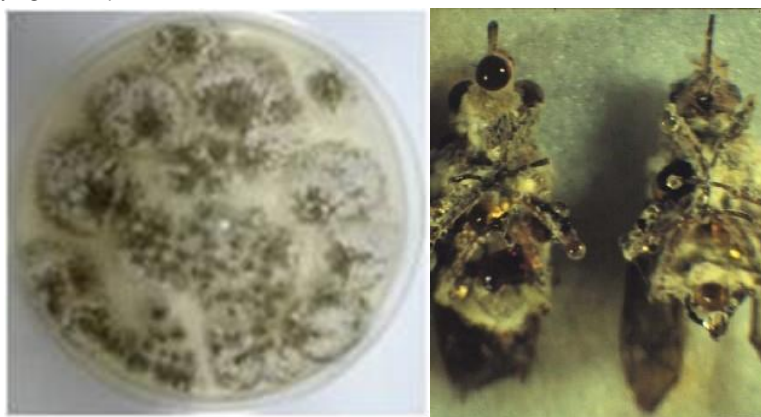
## **ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОМЕТОДА БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ**

Биологические агенты применяли для уничтожения вредителей с древнейших времен. Китайцы использовали фараоновых муравьев для уничтожения вредителей в зернохранилищах (6-5 в. до н.э.).

Во времена Аристотеля (4 в. до н.э.) в период интенсивного одомашнивания пчел и тутового шелкопряда человек сталкивался с массовыми заболеваниями этих насекомых.

Идея использования биологических патогенов для борьбы с насекомыми-вредителями принадлежит И. И. Мечникову (1879). Этот период можно считать началом развития биометода. Луи Пастер предложил применять бактерию – возбудитель куриной холеры для борьбы с дикими кроликами.

Возбудитель болезни хлебного жука – мускаринный гриб (*Metarhisiium anisopliae*) был рекомендован для использования в борьбе с жуком – вредителем злаковых.



**Рисунок 1 – возбудитель зеленой мускардины *Metarhisiium anisopliae***

В Японии в 1901 году ученым Ишивата была выделена спорообразующая бактерия *Bacillus thuringiensis*, а в 1911 году Эрнстом Берлинером. Она поражала гусениц чешуекрылых, названная Schläffsucht. *B. thuringiensis* близка по физиологии с *Bacillus cereus*. Характерной особенностью кристаллоносных бактерий является образование помимо эндоспор, параспоровых белков кристаллов, которые получили кристаллов название (дельта)-эндотоксинов ( $\delta$ ).

Кроме кристаллов кристаллоносные бактерии могут вырабатывать по крайней мере 3 других вещества, токсичных для насекомых. К ним относятся альфа-, бета- и гамма-экзотоксины. Штаммы бактерий, утратившие способность образовывать кристаллы, при введении в кишечник гусениц чувствительных насекомых не вызывали заболевания, и жизнеспособные споры проходили через кишечник не прорастая (Вейзер Я.).

Работы в СССР: С. Метальников, В. Шорин и К. Туманов, 1922-1942 гг.:

Выделено и изучено большое число энтомопатогенных форм спорообразующих бактерий, на основе которых было организовано производство инсектицидных препаратов для борьбы с опасными вредителями кукурузы, винограда и хлопчатника.

В 1941 г. в США - Датки разработал и успешно применил метод получения нового инсектицидного препарата для борьбы с японским жуком.

В 1949 г. Е. В. Талалаев (Иркутск) разработал и внедрил в широкую практику метод борьбы с сибирским шелкопрядом с помощью культуры спорообразующей бактерии, принадлежащей к виду *B. thuringiensis*.

### **Бактериальные препараты**

К настоящему времени описано свыше 90 видов бактерий, инфицирующих насекомых. Большая их часть принадлежит к семействам Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae, Bacillaceae.

Большинство промышленных штаммов принадлежит к роду *Bacillus*, и основная масса препаратов (свыше 90 %) изготовлена на основе ***Bacillus thuringiensis* (Bt)**, имеющих свыше 30 серотипов.

*Штаммы Bt используют для борьбы с различными вредителями – гусеницами, комарами, мошкой.*

Бактерии группы *Bacillus thuringiensis* эффективны в отношении 400 видов насекомых, включая вредителей полей, леса, садов и виноградников; наибольший эффект от применения данных препаратов получают при борьбе с листогрызущими вредителями.

Технология получения биопестицидов на основе энтомопатогенных бактерий. Культивирование проводят в периодической гомогенной аэробной глубинной культуре, в строго стерильных и контролируемых условиях.

Цель процесса – получение максимального урожая бактерий и накопление токсина. Основу питательной среды составляет дрожжеполисахаридная смесь и пеногаситель (кашалотовый жир).

Длительность ферментации при 28–30°C в режиме перемешивания и аэрации (0.2 л O<sub>2</sub>/л среды·мин.) составляет 35–40 часов до накопления в культуральной жидкости 5–10 % свободных спор и кристаллов от общего их количества (при титре культуры не менее 1 млрд. спор в 1 мл).

Далее споры и кристаллы отделяются в процессе сепарирования и обезвоживаются. Товарная форма препарата – сухой порошок, а также стабилизированная паста. Выход пасты при влажности 85 % и титре около 20 млрд. спор/г – около 100 г/м<sup>3</sup> культуральной жидкости. Стабилизация пасты осуществляется смешиванием ее с карбоксиметилцеллюлозой, обладающей высокой сорбционной емкостью. Споры и кристаллы в результате стабилизации образуют трехмерную сетчатую структуру, в которую равномерно проникает консервант. На основе пасты в процессе высушивания в распылительной сушилке получают сухой продукт с остаточной влажностью не выше 10 % и с титром 100–150 млрд. спор/г. Препарат усредняется и стабилизируется каолином. Готовый сухой продукт содержит до 30 млрд. спор/г.

### Грибные препараты

Широко распространены в природе виды энтомопатогенных грибов они поражают широкий круг насекомых, обладают для этого различными механизмами, включая контактный, что облегчает их применение.

Грибы хорошо сохраняются в виде спор и продуцируют разнообразные биологически активные вещества, усиливающие их патогенность. Однако грибные препараты не применяются пока достаточно широко.

Наиболее перспективными считаются две группы грибов – мускарисовые грибы из *Euascomycetes* и энтомотрофные из семейства *Entomophthoraceae*.

### Препарат метаризин

*Metarhizium anisopliae* – наиболее известный энтомопатогенный гриб, описанный более 100 лет назад как зеленый мускарисовый гриб.

### Препарат вертициллин на основе гриба *Verticilium lecanii*.

В США производят препарат «Микар» для ограничения численности цитрусовых клещей на основе гриба *Hirsutella thompsonii*.

Препарат боверин на основе конидиоспор *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.



Рисунок 2 – Морфология продуцента *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

Препарат выпускают в виде порошка с титром 2–6 млрд. конидиоспор/г. Боверин почти также эффективен, как лучшие из доступных химических пестицидов. После заражения насекомого *V. bassiana* выделяет боверицин, циклодепсипептид-токсин. Боверин безопасен для человека и теплокровных, не вызывает ожогов у растений.

### Вирусные препараты

Вирусы чрезвычайно контагиозны и вирулентны, узко специфичны по действию, хорошо сохраняются в природе вне организма-хозяина. Эти препараты вследствие высочайшей специфичности практически полностью безопасны для человека и всей биоты. Заражаются насекомые вирусами при питании.

В качестве активного начала содержат особые белковые образования - полиэдры (имеют форму многогранников) или гранулы (имеют овальную форму), внутри которых заключены вирусные частицы (вирионы).

Заглатываемые с кормом полиэдры растворяются в щелочной среде кишечника насекомого, вирусы проникают в ткани и поражают ядра (ядерный полиэдроз) или цитоплазму (цитоплазмальный полиэдроз) живых клеток.

Первый вирусный инсектицид был выпущен компанией «Сандоз» в 70-е годы XX столетия. Препарат предназначен для борьбы с коробочным червем хлопчатника.

В 1960-1990 гг. в России были разработаны и внесены в «Каталог»:

- вирин-ПШМ - против шел копряда-монашенки (*Lymantria monacha*), вызывает ядерный полиэдроз общего типа; вирин-ГСШ - вызывает гранулез у гусениц *сибирского коконопряда* (*Dendrolimus sibiricus*);
- вирин-КШ - против кольчатого шелкопряда (*Malacosoma neustria*), вызывает ядерный полиэдроз общего типа).

До 2003 г. для защиты леса от гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar*) успешно применяли вирусный препарат вирин-ЭНШ. Однако в промышленных масштабах эти препараты не применялись.

## БИОПЕСТИЦИДЫ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ ФИТОПАТОГЕНОВ

Наиболее распространено деление болезней в зависимости от причин их вызывающих: инфекционные и неинфекционные.

Инфекционные болезни вызывают различные возбудители:

- грибы (микозы),
- бактерии (бактериозы),
- Вирусы (вирозы),
- Вироиды (виroidные поражения),
- Микоплазмы (микоплазмозы),
- Простейшие (амебозы),
- Нематоды (нематодозы),
- растения-паразиты.