

Введение

Во второй половине XX века стала набирать темпы новая, наукоемкая, бурно развивающаяся отрасль народного хозяйства – *биотехнология*. Биотехнология базируется как на таких научных дисциплинах как физиология, биохимия, микробиология, медицина, агробиология, молекулярная биология и генетика, клеточная и генетическая инженерия, кибернетика и информатика. Биотехнология – это область знания, позволяющая путем управляемого культивирования организмов получать полезные для человека продукты - пищу, корма, медицинские препараты, разнообразное сырье, доступные растениям формы азота, средства защиты растений и животных, а также утилизировать различные органические отходы.

Целью дисциплины «Основы биотехнологии» является формирование представления о многообразии биотехнологических приемов и методов, используемых в сфере переработки, способах получения биологически активных соединений, конструирования новых продуктов, а также о возможностях создания новых активных форм организмов, отсутствующих в природе.

Лабораторная работа №1

Тема: Биотехнология. Определение, этапы развития. Цели и задачи биотехнологии

Цель работы: ознакомиться с основными направлениями и стадиями биотехнологического производства. Изучить основные объекты биотехнологии.

Порядок выполнения лабораторной работы:

1. Законспектируйте основные понятия.
2. Ответьте на контрольные вопросы.

Биотехнология – это наука, разрабатывающая способы производства практически важных веществ и продуктов питания с использованием живых организмов и методы конструирования новых организмов с заданными свойствами. Биотехнология – междисциплинарная область, возникшая на стыке биологических, химических и технических наук.

Современная биотехнология использует достижения наук биологического цикла, так как базируется на глубоком знании характеристик микроорганизмов, их строения, физиологии, биохимии, генетике, взаимоотношениях в ассоциациях.

На развитие биотехнологии непосредственно влияют химия, физика, математика, механика, которые связаны с кинетикой процессов, влиянием на процессы различных внешних факторов, массо- и энергопереносом. Успехи машиностроения, электроники, автоматизации позволили создать новую аппаратуру и автоматизировать биотехнологические процессы.

Связь с экономическими науками обусловлена постоянной конкуренцией с альтернативными технологиями (химической, сельскохозяйственной).

Основные направления в биотехнологии:

1. Создание новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины.

Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов и к злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост или полностью подавляющие развитие. Всего известно около 5000 антибиотиков, но не все из них допущены для применения в медицине. Это связано с токсичностью существующих антибиотиков, аллергическими реакциями, вызываемыми ими, нарастанием устойчивости патогенных

микроорганизмов к применяемым препаратам и др. Поэтому происходит поиск новых антибиотиков по средствам испытания новых продуцентов, химической модификации, клеточной и генетической инженерии.

Гормоны. Биотехнология предоставляет медицине новые пути получения ценных гормональных препаратов. Раньше гормоны получали из органов и тканей животных и человека. Требовалось много материала для получения небольшого количества продукта. В настоящее время с применением генноинженерных штаммов получают гормон роста (соматотропин), инсулин (регулирует уровень глюкозы в крови), кортизон (гормон надпочечников) и другие гормоны. Это позволяет снизить стоимость препаратов и получать их в больших количествах.

Интерфероны – выделяются клетками человека и животных в ответ на инфицирование вирусами. Они обладают антивирусной активностью. До введения методов генной инженерии интерфероны получали из донорской крови – до 1 мкг неочищенного интерферона из 1 л крови, т.е. примерно одну дозу для инъекции. В настоящее время интерфероны успешно получают с применением генноинженерных штаммов *Escherichia coli*, дрожжей, культивируемых клеток насекомых и млекопитающих. Интерфероны используются для лечения болезней, вызываемых вирусами герпеса, гепатитов и др.

Рекомбинантные вакцины и вакцины-антигены. Вакцинация – один из основных способов борьбы с инфекционными заболеваниями. Путем всеобщей вакцинации ликвидирована натуральная оспа, ограничено распространение бешенства, полиомиелита, желтой лихорадки. Большое экономическое значение имеет разработка вакцин против болезней сельскохозяйственных животных (нпр, ящура). Традиционные вакцинные препараты изготавливают на основе ослабленных или инактивированных возбудителей болезней. Современные биотехнологические разработки предусматривают создание рекомбинантных вакцин и вакцин-антигенов. Вакцины обоих типов основаны на генноинженерном подходе.

Ферменты медицинского назначения. Многообразно применение ферментных препаратов в медицине. Их используют для растворения тромбов, лечения наследственных заболеваний, освобождения организма от токсических веществ и др.

2.Создание микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей, бактериальных удобрений, новых высокопродуктивных сортов и гибридов сельскохозяйственных растений.

Биотехнологические пути защиты растений от болезней и вредителей включают:

- выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам;
- химические средства борьбы с сорняками, грызунами, насекомыми, фитопатогенными грибами, бактериями, вирусами;
- биологические средства борьбы с вредителями, использование их естественных врагов и паразитов, а также токсических продуктов, образуемых живыми организмами.

Наряду с защитой растений ставится задача повышения продуктивности сельскохозяйственных культур, их пищевой (кормовой) ценности, создания сортов растений, растущих на засоленных почвах, в засушливых и заболоченных районах.

3. Создание ценных кормовых добавок для повышения продуктивности животноводства.

Для повышения продуктивности животных нужен полноценный корм. Биотехнологическая промышленность выпускает кормовой белок на базе различных микроорганизмов – бактерий, грибов, дрожжей, водорослей. Богатая белками биомасса микроорганизмов с высокой эффективностью усваивается сельскохозяйственными животными.

Большое значение для животноводства имеет обогащение растительных кормов микробным белком. Для этого широко используются твердофазные процессы.

4. Создание новых технологий получения хозяйственно ценных продуктов для использования в пищевых и других отраслях промышленности.

Аминокислоты (цистеин, метионин, лизин, глутамат) – повышение питательной ценности пищи, усиление аромата мясных, рыбных, грибных изделий.

Олигопептиды (аспартам, тауматин, монеллин) – низкокалорийные, очень сладкие вещества.

Ферменты:

- β -Галактозидаза - производство безлактозного молока, освобождение молочной сыворотки от лактозы, приготовление мороженого;

- микробные протеазы – сыроварение, ускорение созревания теста, производство крекеров;

- фицин, трипсин, бромеланин – ускорение маринования рыбы, удаление мяса с костей;

- липазы – придание специфического аромата сыру, шоколаду, молочным продуктам, улучшение качества взбитых яичных белков;
- глюкозооксидаза в сочетании с каталазой – удаление кислорода из сухого молока, кофе, пива, майонеза, лимонных, апельсиновых и виноградных соков.

Витамины (А, В₁, В₂, В₆, В₁₂, С, D, Е) – повышение питательной ценности пищевых продуктов, антиоксиданты.

Органические кислоты (уксусная, бензойная, молочная, глюконовая, лимонная) – консерванты, ароматизаторы.

5. Создание эффективной технологии переработки и очистки промышленных и бытовых отходов.

Важной составной частью современной биотехнологии является очистка воды от загрязнений, а также утилизация различных промышленных и бытовых отходов. Методы такой очистки основаны на использовании специфических биологических сообществ, носящих название *активного ила*, для глубокой утилизации как органических, так и неорганических загрязнений, оставшихся в воде после других видов очистки.

Контрольные вопросы

1. Что такое биотехнология?
2. В чем заключается взаимосвязь биотехнологии с другими науками?
3. Каковы основные направления развития биотехнологии?
4. Сравните, что отличает современную биотехнологию в ее историческом развитии.
5. Приведите примеры биотехнологических производств.
6. Расшифруйте, что понимают под терминами «агенты» и «процессы» в биотехнологии.
7. Представьте на конкретных примерах возможности воздействия на живую природу для получения продуктов биотехнологии.

Лабораторная работа №2

Объекты и методы биотехнологии

Цель работы: изучить основные объекты и методы биотехнологии.

Порядок выполнения лабораторной работы:

1. Законспектируйте основные понятия.
3. Начертите схему (рис. 1).
4. Сделайте обозначения.
5. Ответьте на контрольные вопросы.

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

Биообъектом может быть целостный сохранивший жизнеспособность многоклеточный или одноклеточный организм. Им могут являться изолированные клетки многоклеточного организма, а также вирусы и выделенные из клеток мультиферментные комплексы, включенные в определенный метаболический процесс. Наконец, биообъектом может быть индивидуальный изолированный фермент.

Функция биообъекта – полный биосинтез целевого продукта, включающий ряд последовательных ферментативных реакций или катализ лишь одной ферментативной реакции, которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта.

Биообъект, осуществляющий полный биосинтез целевого продукта, называется продуцентом. Биообъект, являющийся индивидуальным ферментом или выполняющий функцию одной ферментативной реакции, используемой биотехнологом, называют промышленным катализатором.

Таким образом, к биообъектам относятся как макромолекулы, так и микро- и макроорганизмы.

В качестве макромолекул в промышленном производстве используются ферменты всех известных классов, но наиболее часто – гидролазы и трансферазы. Доказано, что использование ферментов в производстве в иммобилизованном виде, то есть связанных с нерастворимым носителем, наиболее рационально, так как в этом случае обеспечиваются многократность их применения и стандартность повторяющихся производственных циклов.

Как биообъекты микробные клетки прокариот и эукариот в современном биотехнологическом производстве занимают доминирующее положение. Они являются продуцентами используемых в

качестве лекарственных средств первичных метаболитов; аминокислот, азотистых оснований, коферментов, моно- и дисахаров, ферментов медицинского назначения, применяемых в заместительной терапии и т.д.

Микроорганизмы образуют огромное количество вторичных метаболитов, многие из которых нашли применение, например, антибиотики и другие корректоры гомеостаза клеток млекопитающих.

Высшие растения являются традиционным и к настоящему времени все еще наиболее обширным источником получения лекарственных средств. При использовании растений в качестве биообъектов основное внимание сосредоточено на вопросах культивирования растительной тканей на искусственных средах (калусные и суспензионные культуры) и открывающихся при этом новых перспективах.

Традиционными поставщиками лекарственных и диагностических средств являются представители животного мира. Довольно часто в качестве биообъектов выступают млекопитающие, птицы, рептилии, амфибии, членистоногие, рыбы, моллюски. Разнообразие образуемых ими биологически активных соединений, нашедших применение в медицине, крайне велико.

В последние годы в связи с развитием технологии рекомбинантной ДНК стремительно возрастает важность такого биообъекта, как человек, хотя на первый взгляд, это кажется парадоксальным.

В принципе, человек уже давно мог быть отнесен к биообъектам, например, при получении гомологичной антисыворотки или в случае использования тканей и органов человека для их пересадки, например, костного мозга, почек и т.д.

Процессы биотехнологических производств разнообразны, но все они имеют пять общих основных стадий, которые различаются по целям и принципам их достижения. Общая биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза приведена на рис. 1.

1) Получение посевного материала. Посевной материал представляет собой чистую культуру микроорганизмов-продуцентов, размноженную в лабораторных условиях при оптимальном составе питательной среды и режиме выращивания. Культуры микроорганизмов-продуцентов заводы получают из коллекций в пробирках на агаризованных питательных средах или в ампулах. Чистая культура микроорганизма может постоянно или по мере необходимости использоваться в производстве.

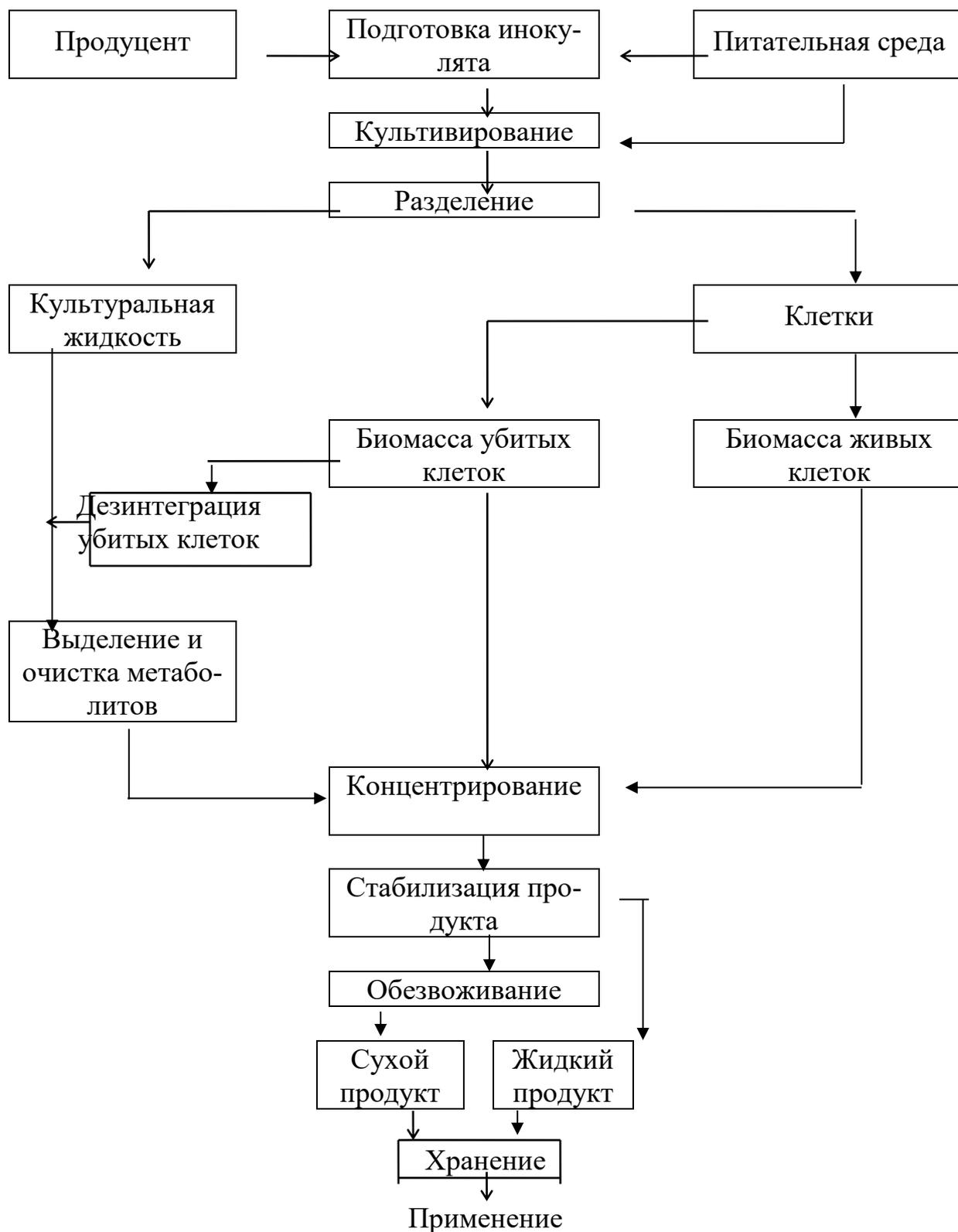


Рисунок 1. Многостадийная биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза

Сначала культуру размножают в лаборатории, затем в цехе чистых культур и инокуляции, далее направляют на культивирование.

2) Приготовление питательной среды – включает смешивание компонентов и стерилизацию. Основу питательных сред для культивирования микроорганизмов составляют источники углерода. Существуют микроорганизмы, способные потреблять углерод только из высокомолекулярных соединений, например белков и пептидов, в то же время многие бактерии и дрожжи утилизируют простейшие углеродосодержащие соединения - метан, этанол, углекислоту. Кроме углерода клетки микроорганизмов нуждаются в источниках азота, фосфора, макро- и микроэлементов.

Вещества этого рода находятся в питательных средах в виде солей, в некоторых случаях азот и фосфор могут усваиваться из органических источников, например автолизатов и гидролизатов микробного или животного происхождения.

Смешивание питательных веществ проводится в реакторах с мешалкой. Растворимые компоненты среды предварительно растворяют в воде. Нерастворимые компоненты (например, кукурузную, соевую муку, мел) – суспензируют. Составление среды считается завершенным, если в результате произведено тщательное измельчение ее твердых компонентов.

Завершающий этап приготовления питательной среды – стерилизация. Наиболее широкое распространение получила термическая стерилизация. Важнейшей проблемой при этом является сохранение питательных свойств среды, так как большинство субстратов, особенно углеводы, оказываются термически нестабильными. Некоторые субстраты не требуют стерилизации, так как сами обладают асептическим действием: метанол, этанол, уксусная кислота и др.

3) Ферментация (культивирование) – это вся совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и стерилизованную питательную среду инокулята (посевного материала) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие истощения питательных веществ среды. Существует два типа ферментаций: получение биомассы микроорганизмов и получение ценных веществ, возникающих в ходе роста или на последующих стадиях развития культуры.

4) Выделение целевого продукта. Стадия выделения и очистки продукта существенно зависит от того, накапливается продукт в клетках или он выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом

является сама клеточная масса. Разделение биомассы и культуральной жидкости - сепарация - осуществляется несколькими методами (флотация, фильтрация, центрифугирование). Если целевой продукт содержится в самих клетках, то проводят разрушение клеток – дезинтеграцию – физическими, химическими и химико-ферментативными способами.

Выделение продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции. Затем выделенный продукт концентрируют ультрафильтрацией, выпариванием или обратным осмосом. После стабилизации продукта в зависимости от того, каким должен быть конечный продукт: сухим или жидким, его обезвоживают или сразу упаковывают и отправляют на хранение и далее - потребителю.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные стадии биотехнологического производства.
2. Что такое посевной материал?
3. Как готовят посевной материал в производственных условиях?
4. Какие компоненты входят в состав питательных сред?
5. Что такое ферментация?
6. Какими методами осуществляется разделение биомассы от культуральной жидкости?
7. В каком случае необходима дезинтеграция клеток?
8. Какие способы концентрирования продукта Вам известны?

Лабораторная работа №3

Тема: Строение микробной клетки. Основные элементы клетки

Цель работы: изучить прокариотическую бактериальную клетку и эукариотическую животную клетку.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Законспектировать основные понятия.
2. Зарисовать строение прокариотической и эукариотической клеток.

Все живые организмы делятся на две основные группы: прокариоты и эукариоты. В основе этой классификации лежат многочисленные структурные различия, из них наиболее основными являются:

- 1) наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;
- 2) строение и химический состав клеточной стенки;
- 3) наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл.

В прокариотической клетке, например бактериальной, хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой, в состав которой часто входит пептидогликан, но не хитин или целлюлоза; в клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл. В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре; клеточная стенка, если она есть, может содержать хитин или целлюлозу, но не пептидогликан; в цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, хлоропласт в клетках растений) (рис. 2).

Бактерия *Escherichia coli* – один из наиболее хорошо изученных организмов. За последние пятьдесят лет удалось получить исчерпывающую информацию о ее генетике, молекулярной биологии, биохимии, физиологии и общей биологии. Это грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Ее средой обитания является кишечник человека, но она также может высеваться из почвы и воды. Благодаря способности размножаться простым делением на средах, содержащих только ионы Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} и SO_4^{2-} , микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу), *E. coli* стала излюбленным объектом научных исследований. При культивировании *E. coli* на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода, время генерации (т. е. время между образованием бактерии и ее делением) в логарифмической фазе роста при температуре 37°C составляет примерно 22 мин.

Для каждого живого организма существует определенный температурный интервал, оптимальный для его роста и размножения. При слишком высоких температурах происходит денатурация белков и разрушение других важных клеточных компонентов, что ведет к гибели клетки. При низких температурах биологические процессы существенно замедляются или останавливаются совсем вследствие структурных изменений, которые претерпевают белковые молекулы. Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их можно подразделить на термофилы (от 45 до

90 °С и выше), мезофилы (от 10 до 47 °С) и психрофилы, или психротрофы (от -5 до 35 °С). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур, могут быть полезным инструментом для решения различных биотехнологических задач.

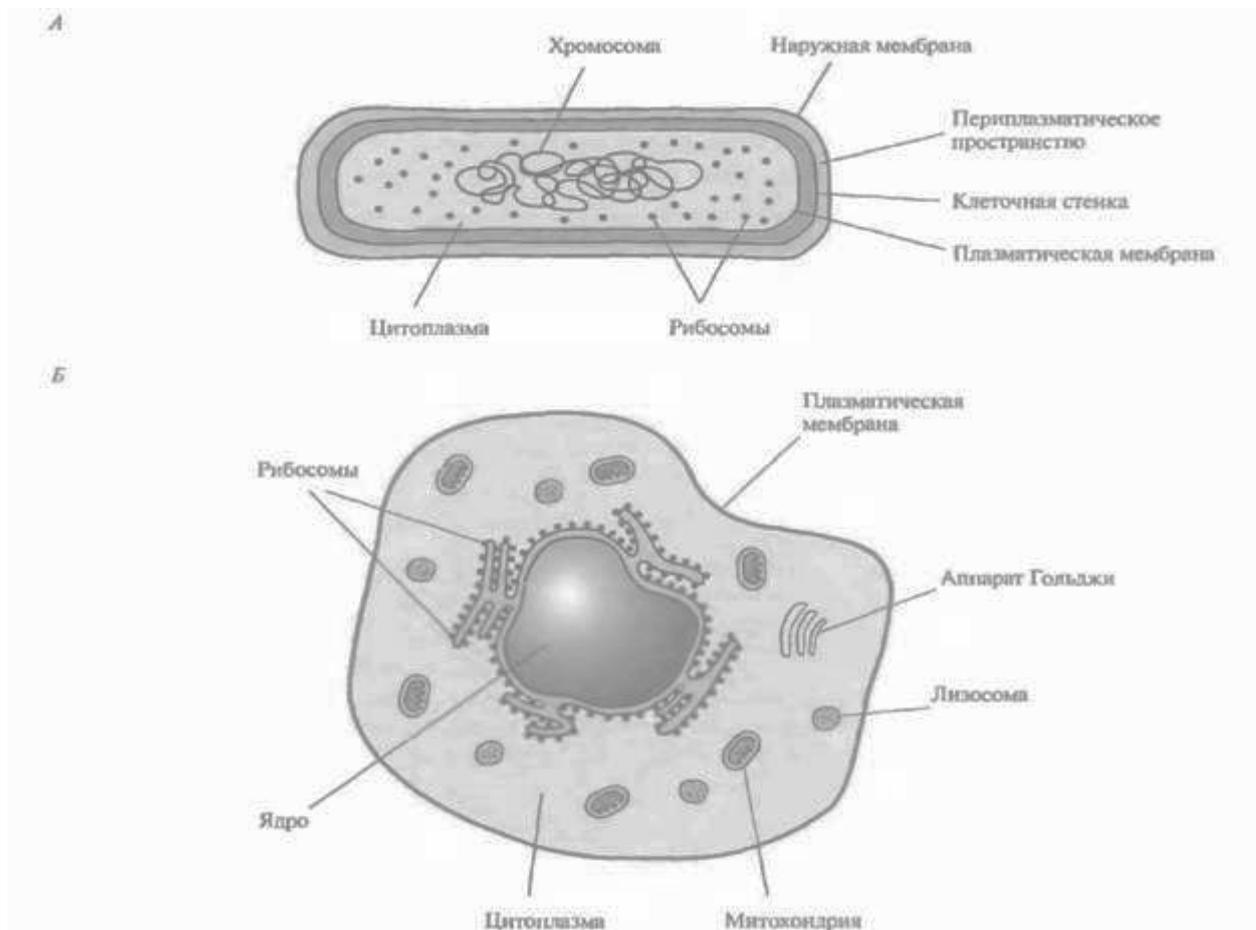


Рисунок 2. Схематическое представление прокариотической бактериальной клетки (А) и эукариотической животной клетки (Б)

Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, которые применяются в промышленных или в лабораторных процессах, а генетически видоизмененные психротрофы используют для биodeградации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде, при пониженных температурах. *E. coli* можно культивировать как в аэробных (в присутствии кислорода), так и в анаэробных (без кислорода) условиях. Однако для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Если целью

культивирования бактерий в лаборатории является синтез и выделение определенного белка, то культуры выращивают на сложных жидких питательных средах в колбах. Для поддержания нужной температуры и обеспечения достаточной аэрации культуральной среды колбы помещают в водяную баню или термостатируемую комнату и непрерывно встряхивают. Такой аэрации достаточно для размножения клеток, но не всегда для синтеза белка. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются не содержанием в питательной среде источников углерода или азота, а содержанием растворенного кислорода: при 20 °С оно равно примерно девяти миллионным долям. Это становится особенно важно при промышленном получении рекомбинантных белков с помощью микроорганизмов. Для обеспечения условий, оптимальных для максимальной продукции белков, конструируют специальные ферментеры и создают системы аэрации.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – это непатогенные одноклеточные микроорганизмы с диаметром клетки примерно 5 мкм, которые во многих отношениях представляют собой эукариотический аналог *E. coli*. Их генетика, молекулярная биология и метаболизм детально изучены. *S. cerevisiae* размножаются почкованием и хорошо растут на такой же простой среде, как и *E. coli*. Их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ издавна использовалась для изготовления алкогольных напитков и хлеба. В настоящее время ежегодно во всем мире расходуется более 1 млн. тонн *S. cerevisiae*. Дрожжи *S. cerevisiae* представляют также большой научный интерес. В частности, они являются наиболее удобной моделью для исследования других эукариот, в том числе человека, поскольку многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae*, сходны с таковыми у человека. Это открытие способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Широко используемая генетическая система дрожжей (искусственная хромосома) является неизменным участником всех исследований по изучению ДНК человека. В 19% г. была определена полная нуклеотидная последовательность всего набора хромосом *S. cerevisiae*, что еще более повысило ценность этого микроорганизма для научных исследований. Такая работа на эукариотах была выполнена впервые.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто приходится подвергать ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения – во многих случаях это необходимо для правильного функционирования

белка. К сожалению, *E. coli* и другие прокариоты не способны осуществлять эти модификации, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae*, а также другие виды дрожжей: *Kluuveromyces lactis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Schizisaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia postons*, *Hansenula pofymorpha*. Наиболее эффективными продуцентами полноценных рекомбинантных белков являются *P. pastoris* и *H. polymorpha*.

Культуры эукариотических клеток. При всех различиях между типами эукариот методические подходы к культивированию клеток насекомых, растений и млекопитающих имеют много общего. Сначала берут небольшой кусочек ткани данного организма и обрабатывают его протеолитическими ферментами, расщепляющими белки межклеточного материала (при работе с растительными клетками добавляют специальные ферменты, разрушающие клеточную стенку). Высвободившиеся клетки помещают в сложную питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу и факторы роста. В этих условиях клетки делятся до тех пор, пока на стенках емкости с культурой не образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкости со свежей питательной средой, то рост прекратится. Обычно удается перенести (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут. Культивируемые клетки сохраняют некоторые свойства исходного клеточного материала, поэтому их можно использовать для изучения биохимических свойств различных тканей.

Часто некоторые клетки перевиваемых первичных клеточных культур претерпевают генетические изменения, в результате которых ускоряется их рост. Культуры клеток, которые при этом приобретают селективные преимущества, оказываются способными к неограниченному росту *in vitro* и называются устойчивыми клеточными линиями. Одни клеточные линии сохраняют основные биохимические свойства исходных клеток, другие нет. У большинства клеток, способных к неограниченному росту, имеются значительные хромосомные изменения, в частности отмечается увеличение числа одних хромосом и потеря других. В молекулярной биотехнологии устойчивые клеточные линии иногда используют для размножения вирусов и для выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК. Кроме того, они применяются для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков.

Контрольные вопросы:

1. Кто такие прокариоты?
2. Кто такие эукариоты?
3. Перечислите основные свойства *Escherichia coli*.
4. Что означает термин «грамотрицательный»?
5. Перечислите основные свойства *S. cerevisiae*.

Лабораторная работа №4

Химический состав бактериальной клетки. Энергетический метаболизм бактерий. Брожение и дыхание. Рост и размножение микроорганизмов (занятие 4-х часовое)

Цель занятия: познакомиться с динамикой биохимических процессов в микробной клетке. Усвоить понятия, связанные с различными сторонами метаболизма.

Порядок выполнения лабораторной работы:

1. Законспектируйте основные понятия.
2. Начертите схему (рис. 3 и график, отражающий этапы развития культуры (рис. 3)). Сделайте обозначения.
3. Заполните таблицу 1.
4. Ответьте на контрольные вопросы.

Бактериальная клетка на 80-90% состоит из воды и только 10% приходится на долю сухого вещества. Вода в клетке находится в свободном или связанном состоянии. Она выполняет механическую роль в обеспечении тургора, участвует в гидролитических реакциях. Удаление воды из клетки путем высушивания приводит к приостановке процессов метаболизма, прекращению размножения, а для многих микроорганизмов губительно. В то же время особый способ высушивания микроорганизмов в вакууме из замороженного состояния (лиофилизация) обеспечивает сохранение жизнеспособности большинства микроорганизмов. Лиофилизация используется для приготовления проб, пригодных для длительного хранения.

В сухом веществе бактерий 52% составляют белки, 17% - углеводы, 9% - липиды, 16% - РНК, 3% - ДНК и 3% - минеральные вещества.

Белки являются ферментами, а также составной частью клетки, входят в состав цитоплазматической мембраны (ЦПМ) и ее производных, клеточной стенки, жгутиков, спор и некоторых капсул. Некоторые бактериальные белки являются антигенами и токсинами бактерий.

В состав белков бактерий входят отсутствующие у человека D-аминокислоты, а также диаминопимелиновая кислота.

Углеводы представлены в бактериальной клетке в виде моно-, ди-, олигосахаров и полисахаридов, а также входят в состав комплексных соединений с белками, липидами и другими соединениями. Полисахариды входят в состав некоторых капсул, клеточной стенки; крахмал и гликоген являются запасными питательными веществами. Некоторые полисахариды принимают участие в формировании антигенов.

Липиды или **жиры** входят в состав ЦПМ и ее производных, клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также служат запасными веществами, входят в состав эндотоксина грамотрицательных бактерий, в составе ЛПС формируют антигены. В бактериальных жирах преобладают длинноцепочечные (C14-C18) насыщенные жирные кислоты и ненасыщенные жирные кислоты, содержащие одну двойную связь. Сложные липиды представлены фосфатидилинозитом, фосфатидилглицерином и фосфатидилэтаноламином. У некоторых бактерий в клетке находятся воски, эфиры миколовой кислоты. Микоплазмы - единственные представители царства Procaruotaе, имеющие в составе ЦПМ стеролы. Остальные бактерии в составе ЦПМ и ее производных не имеют стеролов.

В бактериальной клетке присутствуют все типы РНК: иРНК, транспортная РНК (тРНК), рРНК, менее известная антисенсРНК (асРНК). Молекулы асРНК пока не обнаружены в клетках эукариот. Информация об асРНК записана в хромосоме, в так называемых антисенс-генах. АсРНК принимает активное участие в регуляции различных клеточных процессов, в том числе репликации ДНК бактерий, вирусов, плазмид и танспозонов. асРНК представляет собой короткую молекулу, комплементарную определенному участку иРНК, и, соединяясь с ней, блокирует процесс синтеза белка. При этом в клетке подобные комплексы могут накапливаться, и при диссоциации асРНК и иРНК одновременно начинается синтез белка на большом числе однотипных. Искусственные молекулы асРНК пытаются использовать для борьбы с бактериями за счет угнетения ими синтеза в клетке определенных жизненно важных белков.

Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды – это те строительные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты. Кроме того, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды входят в состав многих коферментов и служат для активации и переноса аминокислот, моносахаров, органических кислот.

Бактерии, обладающие окислительным метаболизмом, энергию получают путем дыхания. **Дыхание** – процесс получения энергии в реакциях окисления-восстановления, сопряженных с реакциями окислительного фосфорилирования, при котором донорами электронов могут быть органические (у органотрофов) и неорганические (у литотрофов) соединения, а акцептором - только неорганические соединения. Схема обмена веществ у бактерии представлена на рисунке 3.

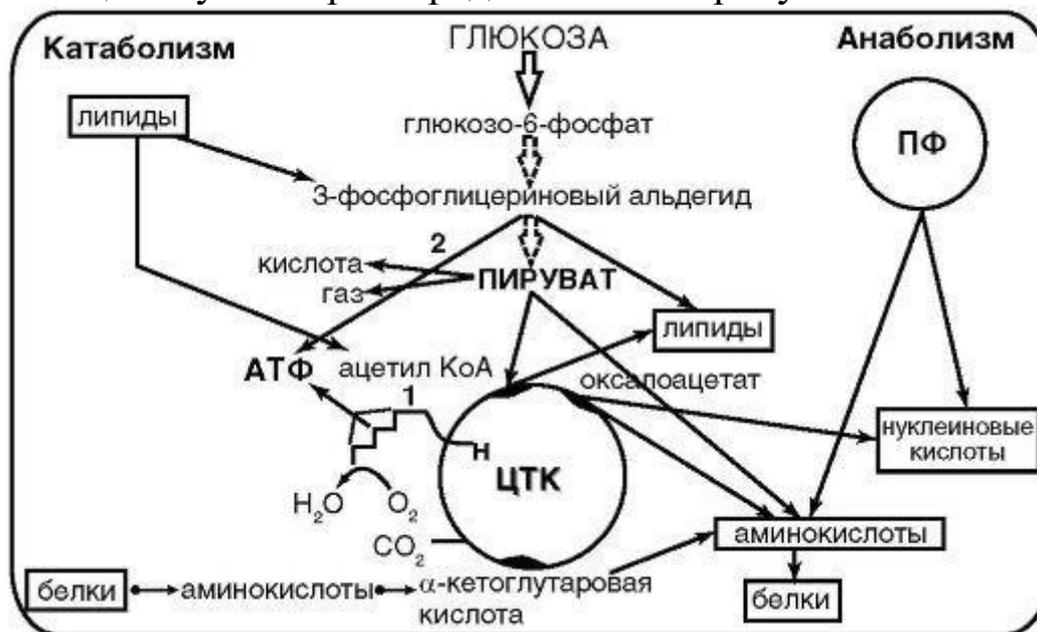


Рисунок 3. Схема обмена веществ у бактерий

У бактерий, обладающих окислительным метаболизмом, акцептором электронов (или водорода $[H^+]$) является молекулярный кислород. В этом случае пируват полностью окисляется в цикле трикарбоновых кислот до CO_2 . Цикл трикарбоновых кислот выполняет функции поставщика как предшественников для биосинтетических процессов, так и атомов водорода, который в форме восстановленного НАД переносится на молекулярный кислород через серию переносчиков, обладающих сложной структурно оформленной мультиферментной системой - дыхательной цепью. Дыхательная цепь у бактерий локализована в ЦПМ и во внутриклеточных мембранных структурах. Типичная цепь выглядит следующим образом: ЦТК \rightarrow НАД(H_2) \rightarrow флавопротеид \rightarrow хинон \rightarrow цитохромы: $b\ c\ a \rightarrow O_2$.

Конечным этапом переноса электронов (протонов) по дыхательной цепи является восстановление цитохромов $a + a_3$ (цитохромоксидазы). Цитохромоксидаза является конечной оксидазой, передающей электроны на кислород. Образующиеся при окислении ФАД или хинонов протоны связываются ионами O_2^- с образованием воды.

В то время как у эукариотов ферменты дыхательной цепи имеют относительно постоянный состав, у бактерий встречаются вариации в составе дыхательной цепи. У некоторых бактерий цитохромы отсутствуют и при контакте с кислородом происходит непосредственный перенос водорода на кислород с помощью флавопротеидов, конечным продуктом при этом оказывается перекись водорода (H_2O_2).

Помимо углеводов, прокариоты способны использовать другие органические соединения, в частности белки, в качестве источника энергии, окисляя их полностью до CO_2 и H_2O .

Анаэробное дыхание. Некоторые бактерии обладают способностью использовать в анаэробных условиях нитрат как конечный акцептор водорода. Восстановление нитрата может происходить двумя путями: аммонификацией, при которой нитрат превращается в аммиак, и денитрофикацией, при которой происходит восстановление нитрата до молекулярного азота или закиси азота. Этот процесс связан с деятельностью фермента нитратредуктазы.

Сульфатное дыхание. Использовать сульфат как конечный акцептор водорода при анаэробном дыхании способна лишь небольшая группа бактерий, включающая только два рода: *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*. Эти бактерии являются строгими анаэробами, они обитают в сероводородном иле и не имеют значения в медицинской микробиологии. Они способны использовать в качестве донора электронов молекулярный водород, поэтому их относят к хемолитотрофам. Этим бактериям принадлежит ведущая роль в образовании сероводорода в природе.

Ферментация белков. Если для бактерий с бродильным метаболизмом источником энергии служат белки, то такие бактерии называются пептолитическими. Пептолитические бактерии гидролизуют белки и сбрасывают аминокислоты. Многие аминокислоты сбрасываются совместно с другими, при этом одна выполняет функцию донора, а другая - функцию акцептора водорода. Аминокислота-донор дезаминируется в кетокислоту, которая в результате окислительного декарбоксилирования превращается в жирную кислоту.

Рост бактериальных клеток связан с синтезом и накоплением всех компонентов, входящих в ее состав, и увеличением размера, характерного для данного вида. В условиях, обеспечивающих рост микробов, происходит и процесс их деления. Для большинства бактерий характерно поперечное бинарное деление, приводящее к образованию двух дочерних клеток. У грамположительных бактерий при этом

происходит синтез перегородки между делящимися клетками. Перегородка начинает формироваться на периферии и «движется» к центру клетки. Для грамотрицательных бактерий характерно первоначальное формирование перетяжки, отделяющей клетки. После ее образования окончательное разделение дочерних клеток сопровождается синтезом перегородки между ними. Размножение бактерий бинарным делением приводит к росту числа бактериальных клеток в геометрической прогрессии. При внесении бактерий в питательную среду они растут и размножаются до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых компонентов среды не достигает минимума, после чего рост и размножение прекращаются. Если на протяжении всего этого времени не прибавлять питательные вещества и не удалять конечные продукты обмена, то получаем *статическую бактериальную культуру*. Статическая (периодическая) культура бактерий ведет себя как многоклеточный организм с генетическим ограничением роста. Если построить график, по оси абсцисс которого отложить время, а по оси ординат - число клеток, то получим кривую, описывающую зависимость числа образующихся клеток от времени размножения, которая называется кривой роста (рис. 4).

На кривой роста бактерий в жидкой питательной среде можно различить несколько фаз, сменяющих друг друга в определенной последовательности.

Начальная – **лаг-фаза** (от англ. *lag* - отставать), охватывает промежуток времени между инокуляцией (посевом бактерий) и началом размножения. Ее продолжительность в среднем 2-5 ч и зависит от состава питательной среды и возраста засеваемой культуры. Во время лаг-фазы происходит адаптация бактериальных клеток к новым условиям культивирования, идет синтез индуцибельных ферментов.

Экспоненциальная (логарифмическая) фаза характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток. Эта скорость зависит от вида бактерий и питательной среды. Время удвоения клеток называется временем генерации, которое варьирует от вида бактериальной культуры: у бактерий рода *Pseudomonas* оно равняется 14 мин, а у *Mycobacterium* - 24 ч. Величина клеток и содержание белка в них во время экспоненциальной фазы остаются постоянными. Бактериальная культура в этой фазе состоит из стандартных клеток.

Стационарная фаза наступает тогда, когда число клеток перестает увеличиваться. Так как скорость роста зависит от концентрации питательных веществ, то при уменьшении содержания последних в

питательной среде уменьшается и скорость роста. Снижение скорости роста происходит также из-за большой плотности бактериальных клеток, снижения парциального давления кислорода, накопления токсичных продуктов обмена. Продолжительность стационарной фазы составляет несколько часов и зависит от вида бактерий и особенностей их культивирования.

Фаза **отмирания** наступает вследствие накопления кислых продуктов обмена или в результате автолиза под влиянием собственных ферментов. Продолжительность этой фазы колеблется от десятка часов до нескольких недель.



Рисунок 4 – Кривая бактериального роста

Продолжительность жизни бактерий мало изучена. Известно, что мезофилы на питательной среде при комнатной температуре в условиях, когда размножение бактерий минимально, могут сохранять свою жизнеспособность в течение 1-2 лет. Очевидно, что биологическая смерть бактерий в большей степени связана с ограничением числа возможных делений. Считается, что большинство бактерий могут делиться около 50 раз, после чего клетка погибает. Механизмы гибели остаются не до конца изученными, но показано существование у бактерий генов, изменение активности которых специфически направлено на самоуничтожение клеток. Постоянное нахождение бактериальной популяции в логарифмической фазе роста наблюдается в непрерывной культуре, что достигается постепенным дозированием поступления

питательных веществ, контролем плотности бактериальной суспензии и удалением метаболитов. Непрерывные бактериальные культуры используются в биотехнологических процессах.

Накопление бактериальной массы (числа бактерий) при культивировании зависит от многих факторов (качество питательных сред, посевная доза, температура выращивания, рН, наличие активирующих рост добавок и др.).

На жидких питательных средах рост и размножение бактерий проявляются в виде диффузного помутнения, образования придонного осадка или поверхностной пленки. Особенностью размножения бактерий роста *Leptospira* на жидких средах является отсутствие видимых проявлений роста.

На плотных питательных средах бактерии образуют скопление клеток - колонии, которые принято считать потомком одной клетки. Колонии различаются формой, размерами, поверхностью, прозрачностью, консистенцией и окраской. Колонии с гладкой блестящей поверхностью принято называть колониями в S-форме (от англ. *smooth* - гладкий). Колонии с матовой шероховатой поверхностью называют R-формами (от англ. *rough* - шероховатый).

Окраска колоний определяется способностью бактерий синтезировать пигменты. Пигменты различаются по цвету, химическому составу и растворимости. Пигменты предохраняют бактериальную клетку от УФ-лучей, обезвреживают токсичные кислородные радикалы, обладают антибиотическими свойствами, принимают участие в реакциях, сопутствующих фотосинтезу в фототрофных бактериях.

Заполните таблицу 1.

Таблица 1 – Характеристика этапов развития культуры микроорганизмов

| Фаза развития | Описание | Темпы роста | Метаболиты |
|---------------|----------|-------------|------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Контрольные вопросы:

1. В чем проявляется эффект Пастера?
2. Как взаимосвязаны различные типы брожения?
3. Укажите отличия первичного и вторичного метаболизма.

4. Укажите факторы, которые играют основную роль при накоплении микробной биомассы.

Лабораторная работа №5

Методы культивирования микроорганизмов

Цель занятия: познакомиться с процессами выращивания микробной массы. Изучить принципы поверхностного и глубинного культивирования микроорганизмов.

Порядок выполнения лабораторной работы:

1. Законспектируйте основные понятия.
2. Начертите схему (рис. 5).
3. Сделайте обозначения.
4. Ответьте на контрольные вопросы.

При **поверхностном** методе культивирования продуцентов ферментов культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Микробная масса полностью обволакивает и прочно скрепляет твердые частицы, клетки получают питание за счет содержащихся в этих средах веществ и используют для дыхания кислород воздуха, поэтому для их нормального обеспечения кислородом приходится применять рыхлые по своей структуре среды с небольшой высотой слоя. Недостатком метода является необходимость больших площадей для выращивания. Главное преимущество поверхностного метода – более высокая конечная концентрация фермента на единицу массы среды. Поверхностные культуры можно быстро и легко высушить, их легко перевести в товарную форму и транспортировать. Меньше потребность электроэнергии по сравнению с глубинным методом.

Глубинный метод культивирования заключается в выращивании микроорганизмов в жидкой питательной среде. Он технически более совершенен, чем поверхностный, так как легко поддается механизации и автоматизации (рис. 5). Весь процесс должен проводиться в строго асептических условиях, что с одной стороны, является преимуществом метода, а с другой – составляет наибольшую техническую трудность, т.к. нарушение асептики часто приводит к прекращению образования фермента.

Широко применяют **периодическое культивирование с подпиткой:** помимо внесения питательного субстрата в реактор до введения в него биообъекта, в процессе культивирования в аппарат добавляют питательные вещества через определенные промежутки времени

порциями или непрерывно «по каплям». Иногда дополнительно вносят биообъект. Существует также **отъемно-доливочное культивирование**, когда часть объема из биореактора время от времени изымается при добавлении эквивалентного объема среды. Это приводит к регулярному омолаживанию культуры и к задержке ее перехода к фазе отмирания. Такой режим культивирования в значительной мере уподобляется непрерывному процессу, поэтому называется также **полунепрерывным культивированием**.

Концентрация фермента в среде при глубинном культивировании обычно значительно ниже, чем в водных экстрактах поверхностной культуры. Фильтраты культуральных жидкостей содержат не более 3% сухих веществ. Это вызывает необходимость предварительного концентрирования фильтратов перед тем, как выделять ферменты любым методом.

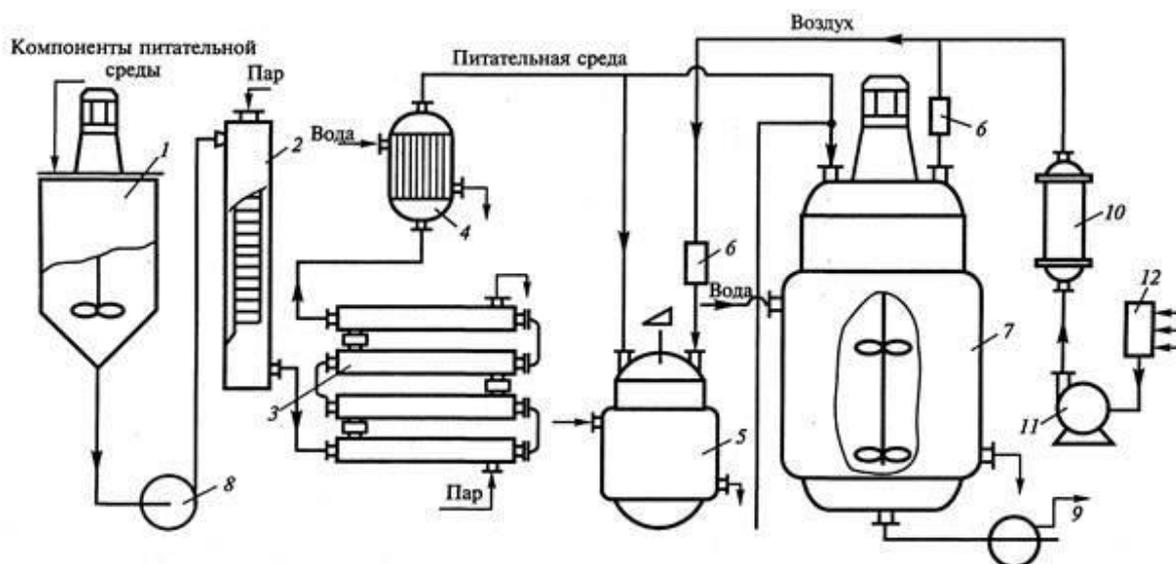


Рисунок 5 – Принципиальная технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов. Обозначения: 1 – смеситель питательной среды; 2 – колонка для непрерывной стерилизации потока питательной среды; 3 – теплообменник - выдерживатель; 4 – теплообменник для охлаждения потока питательной среды; 5 – инокуляторы (или посевные аппараты); 6 – индивидуальный фильтр для очистки воздуха; 7 – ферментер; 8,9 – насосы; масляный фильтр для предварительной очистки воздуха; 11 – компрессор; 12 – головной фильтр для очистки воздуха

Система называется закрытой, если ни одна составная часть этой системы после начала процесса в биореакторе не вводится и не выводится. В периодическом процессе в ферментер сначала подают все питательные вещества, водную фазу и посевной материал. Процесс

идет в соответствии с кривой роста микроорганизмов с заключительным замиранием реакции, обусловленным недостатком субстрата, накоплением токсических метаболитов, неблагоприятным изменением физико-химических условий окружающей среды (рН, температура, парциальное давление кислорода, вязкость), гибелью и лизисом микроорганизмов. Во время культивирования все параметры непрерывно изменяются.

Развитие управляемых периодических процессов привело к созданию **объемно-доливочной системы**: в процессе культивирования главные компоненты среды добавляют дробно, чем исключают субстратное ингибирование. Никакие жидкие компоненты из среды не отводят.

Открытые системы работают в непрерывном потоке. В процессе реакции часть отработанной питательной среды из биореактора удаляют и добавляют новую, что обеспечивает непрерывность процесса. В единицу времени субстрата вводят не больше, чем может переработать культура. Проводят непрерывное культивирование по крайней мере с одной лимитирующей рост концентрацией вещества. Регулирование осуществляют поддержанием концентрации биомассы или продукта на постоянном уровне путем изменения концентрации субстрата (**турбидостат**) или применения строго лимитированной концентрации питательных веществ с соответствующим изменением концентрации клеток или продукта (**хеMOSTAT**).

Все процессы культивирования можно разделить на две большие группы - периодические и непрерывные.

При **периодическом способе** производства простерилизованный ферментер заполняется питательной средой, часто уже содержащей нужные микроорганизмы. Биохимические процессы в этом ферментере продолжаются от нескольких часов до нескольких дней. При этом типе культивирования клеточная культура может пройти все фазы своего развития (рис. 6):

1) **Lag-фазу**, или фазу задержанного роста, при которой клетки растут медленно и адаптируются к новой среде обитания в объеме ферментера;

2) фазу ускорения – когда адаптация закончилась и клетки начинают интенсивно делиться

3) **Log-фазу**, характеризующаяся интенсивным делением клеток и сбалансированностью роста всей популяции;

4) фазу замедленного роста, связанную с истощением питательных субстратов и накоплением токсических продуктов метаболизма;

5) **Const-фазу** или стационарную фазу, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих;

6) фазу отмирания, характеризующуюся прогрессирующей гибелью клеток.

Синтез первичных метаболитов наиболее интенсивно идет с середины Log-фазы до середины стационарной. Ближе к концу стационарной фазы может начаться синтез вторичных метаболитов.

Периодически ферментер опорожняют, моют, стерилизуют, целевой продукт отправляют на очистку, и начинают новый цикл.

Системы, функционирующие в таких условиях, характеризуются как **batch-системы** (замкнутые системы). Большинство современных биотехнологических систем функционируют как batch-процессы, при которых однажды оптимизированные условия обеспечивают максимальное накопление целевого (требуемого) продукта.

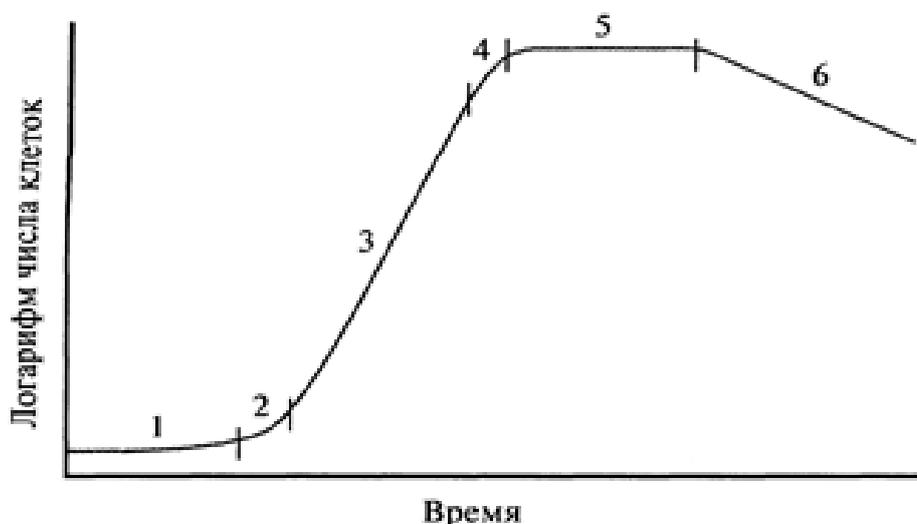


Рисунок 6 – Кривая роста бактериальной культуры при периодической ферментации: 1 – лаг-фаза, 2 – фаза ускорения, 3 – экспоненциальная фаза, 4 – фаза замедления, 5 – стационарная фаза, 6 – фаза отмирания.

При **непрерывном способе** подача равных объемов сырья (питательных веществ) и отвод культуральной жидкости, содержащей клетки продуцента и целевой продукт осуществляется одновременно. Такие ферментационные системы характеризуются как

открытые. Через некоторое время после начала процесса в таком ферментере устанавливается динамическое равновесие между процессами размножения клеток с одной стороны и процессами отмирания и вымывания живых клеток их аппарата с другой. В результате концентрация клеток устанавливается на определенном уровне, задаваемом технологическим режимом (скоростью потока, количеством питательных веществ, температурой). Принцип непрерывного проточного культивирования похож на непрерывные процессы в химической технологии и подобно им может реализовываться по двум основным схемам:

1. процесс идеального (полного) вытеснения;

2. процесс идеального (полного) смешения;

Реактор для выращивания микроорганизмов в процессе полного вытеснения в общем виде представляет собой трубу, расположенную вертикально или горизонтально. При этом в один конец медленно втекает среда и посевной материал (микроорганизмы), а из другого конца вытекает культуральная жидкость. При этом из-за примерно одинаковой скорости движения и отсутствия завихрений перемешивания слоев жидкости в реакторе не происходит (ламинарный режим). Уменьшение концентрации питательных веществ и накопление продуктов биосинтеза, а так же клеточной биомассы происходит в таком реакторе не только во времени, но и в пространстве (от начала реактора к концу). В таком режиме обычно проводят анаэробное культивирование. Процесс полного вытеснения применяется в крупнотоннажных производствах в тех случаях, когда желательно избежать потери времени на опорожнение, стерилизацию и заполнение емкости (производство пива).

Если целевой продукт является эндометаболитом, т.е. находится внутри клетки, то для получения более плотной клеточной культуры проводят **периодическое культивирование в режиме диализа**. При этом питательный субстрат постоянно поступает в реактор через специальную мембрану и через нее же отводится часть культуральной жидкости без клеток. Диализ ведет к снижению концентрации продуктов жизнедеятельности клеток, неблагоприятно влияющих на их жизнеспособность. Этот метод не нужно путать с непрерывным проточным культивированием.

В зависимости от того, на каком принципе основано поддержание постоянства концентрации клеток различают **турбидостатический и хеMOSTАТИЧЕСКИЙ** режимы непрерывного культивирования.

При **турбидостатическом режиме** культивирования постоянство концентрации клеток обеспечивается управляемым изменением скорости потока жидкости через аппарат за счет подачи больших или меньших объемов питательной среды. Наиболее распространенным методом определения концентрации клеток в культуральной жидкости является измерение светорассеивания (мутности) выходящего из ферментера потока с помощью прибора-нефелометра, измеряющего мутность жидкости по величине светорассеяния. Сам прибор посредством электрической схемы связан с насосом для подачи питательной среды или вентилем (краном), регулирующим эту подачу. Повышение концентрации клеток в культуральной жидкости, приводит к увеличению светорассеяния, что автоматически вызывает увеличение объема подаваемой в аппарат свежей питательной среды, и что, в свою очередь, приводит к вымыванию избыточных клеток. Наоборот, при уменьшении светорассеяния (снижении концентрации клеток) скорость потока жидкости через аппарат уменьшается и соответственно уменьшается процесс их вымывания из ферментера.

Недостатком турбидостатического режима является то, что в этом режиме невозможно достигнуть полного усвоения питательных веществ и при выделении целевого продукта они могут безвозвратно теряться или загрязнять его, усложняя процесс очистки. При длительном культивировании в турбидостате возникает довольно серьезная проблема, связанная с прилипанием клеток к фотоэлементу и искажения его показаний. Однако имеются и определенные преимущества. Так, например, если засеивается смешанная культура, то в турбидостате автоматически отбирается более быстро растущий вид, что может использоваться для предохранения его от заражения посторонней микрофлорой (если, конечно, она растет медленнее) и селекции определенных форм.

При **хемотростическом режиме** поддержание постоянства концентрации культуры продуцента осуществляется за счет регулирования не выходящего, а входящего потока. Сущность регулирования состоит в том, что концентрацию основного питательного вещества (или одного из основных), поступающего в реактор устанавливают на определенном уровне, который ограничивает (лимитирует) степень размножения микроорганизмов, поддерживая тем самым культуру микроорганизма в определенной нужной концентрации. Такой

метод регулирования называется **хемотратическим**, а реактор - **хемотратом**.

Хемотраты применяются в процессах, характеризующихся малой скоростью протока жидкости и низкой концентрацией питательных веществ, что облегчает саморегулировку системы. Недостатком хемотратического метода регулирования является то, что в этом случае обычно не удается получить продукты в достаточно высокой концентрации и добиться полной утилизации питательных веществ.

Эффективным способом решения этой проблемы является использование так называемых **иммобилизованных биокаталитаторов** (клеток или ферментов). Процесс **иммобилизации** заключается в (закреплении) молекул фермента или целых живых клеток на (или в) специальных носителях или насадках значительно большего (на много порядков) размера. При этом биокаталитатор из фактически гомогенного становится гетерогенным. После окончания процесса такой каталитатор легко отделить фильтрованием от культуральной жидкости, очистить, а иногда даже регенерировать. Такие каталитаторы обычно имеют большой срок действия, по сравнению с иммобилизованными, удобны в обращении, но имеют гораздо более высокую стоимость и требуют использования специально сконструированных для их использования ферментеров, что препятствует их широкому использованию.

Контрольные вопросы:

1. Какие способы культивирования микроорганизмов - объектов биотехнологии вам известны?
2. В чем заключаются принципиальные отличия культивирования в открытых и закрытых системах?
3. Укажите преимущества и недостатки турбидостатического и хемотратического режима культивирования.
4. Что такое иммобилизованные биокаталитаторы?
5. Принцип и назначение процесса иммобилизации ферментов.

Лабораторная работа №6

Устройство светового микроскопа. Люминесцентная микроскопия. Устройство электронного микроскопа

Цель занятия: ознакомиться с принципом работы и устройством светового микроскопа. Получить представление об основных видах микроскопии и ее значении в практике биотехнологии.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Законспектировать основные понятия.
2. Познакомиться с устройством светового микроскопа.
3. Зарисовать прибор, сделав обозначения.
4. Ознакомиться с различными видами микроскопов и основными правилами микроскопирования.
5. Зарисовать схему устройства электронного микроскопа.
6. Заполнить таблицу 2.
7. Ответить на контрольные вопросы.

Микроскоп. Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, величины которых измеряются микрометрами ($1 \text{ мкм} = 0,001 \text{ мм}$), нанометрами ($1 \text{ нм} = 0,001 \text{ мкм}$), ангстремами ($1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ нм}$), возможно только с помощью микроскопов.

Наиболее распространены и удобны для микробиологических исследований прозрачных объектов в проходящем свете микроскопы МБИ-1, МБР-1, БИОЛАМ 70Р (рабочий), С (студенческий), Д (дорожный).

Микроскоп имеет механическую и оптическую части (рис. 7).

Механическая часть микроскопа включает штатив с предметным столиком, тубус, макро- и микрометрические винты. Верхняя часть штатива - тубусодержатель - может перемещаться на 50 мм с помощью механизма, приводимого в действие вращением макрометрического и микрометрического винтов, предназначенных для грубой и тонкой фокусировки препарата. При вращении этих винтов по часовой стрелке тубусодержатель микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки - поднимается. В верхней части тубусодержателя находится револьвер, в отверстия которого ввинчиваются объективы и тубус.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, объектива и окуляра.

Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсора. Зеркало отражает падающий на него свет и направляет его в конденсор. Одна сторона зеркала плоская, и ее используют при любом источнике света и при любом увеличении. Другую, вогнутую, сторону зеркала употребляют при малых увеличениях без конденсора. Конденсор, состоящий из нескольких линз, собирает отраженный от зеркала свет в пучок, направляемый непосредственно на плоскость препарата. Под конденсором имеется ирисовая диафрагма и откидная оправа для светофильтра. Ирисовая диафрагма служит для задержания лишних лучей света и позволяет при необходимости уменьшить апертуру конденсора

(апертура – это “охват” линзы, она характеризуется количеством лучей, попадающих в линзу).

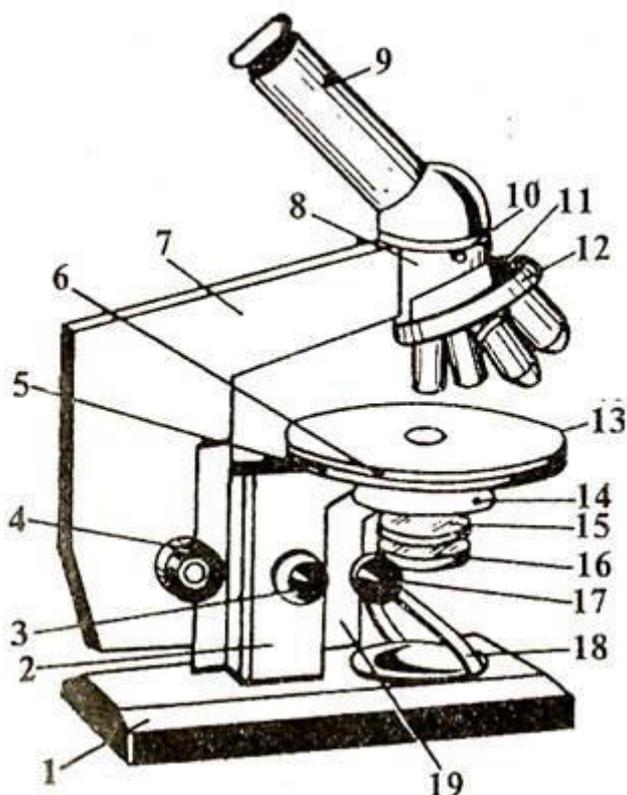


Рисунок 7 – Схема микроскопа «Биолам». Обозначения: 1 –основание микроскопа; 2 –коробка с механизмом микрометрического фокусирования; 3 – микрометрический винт; 4 – макрометрический винт; 5 и 6 – винты для перемещения столика; 7 – тубусодержатель; 8 – головка микроскопа; 9 – насадка монокулярная (тубус с окуляром); 10 – винт для крепления насадки; 11 – винт, фиксирующий револьвер относительно тубуса; 12 – револьвер с объективами; 13 – предметный столик; 14 – винт для крепления конденсора; 15 – конденсор; 16 – дополнительная линза; 17 – рукоятка кронштейна; 18 – зеркало; 19 – кронштейн.

Объектив представляет собой наиболее важную часть микроскопа. Он состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу, которые дают действительное увеличенное обратное изображение. В микроскопах МБР-1, БИОЛАМ используются объективы, дающие увеличение в 8, 40 и 90 раз. Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния фронтальной линзы и, следовательно, от ее

кривизны. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Поэтому, чем большее увеличение дает объектив, тем ниже его следует опускать над плоскостью препарата. При 8х объективе расстояние между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом равно 8,53 мм, при 40х - 0,4 мм, при 90х - 0,1 мм. Изображение, получаемое при помощи линз, обладает рядом недостатков - aberrаций. Наиболее существенные - сферическая (каждая точка объекта имеет вид кружочка, а не точки, изображение не резкое, размытое) и хроматическая (получаемое изображение приобретает окраску, которую не имеет объект) aberrации. Объективы, у которых aberrации скорректированы не полностью, называются ахроматами. Они содержат до шести линз и дают изображение наиболее резкое в центре. Более совершенные объективы - апохроматы - могут состоять из 10-12 линз, хроматическая погрешность в них в 10 раз меньше, чем у ахроматов. Планохроматы полностью устраняют искривление поля зрения, их применяют при микрофотографировании.

Окуляр служит для рассмотрения изображения объекта, увеличенного с помощью объектива, и содержит две линзы: глазную (верхнюю) и собирающую (нижнюю). Окуляры могут давать увеличение в 5, 7, 10, 12, 15 и 20 раз, что указано на их оправе.

Увеличение, которое дает микроскоп, определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра.

Бинокляры имеют дополнительное увеличение насадки (она предназначена для наблюдения объекта одновременно двумя глазами). Однако общее увеличение еще не характеризует всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может оказаться как четким, так и нечетким. Отчетливость получаемого изображения определяется разрешающей способностью микроскопа - минимальным расстоянием между двумя точками, когда они еще не сливаются в одну. Чем больше разрешающая способность микроскопа, тем меньшей величины объект можно увидеть. Повысить ее можно двумя путями: либо освещая объект короткими лучами света, например УФ, либо увеличивая показатель преломления среды (n), граничащей с линзой, с тем, чтобы приблизить его к показателю преломления стекла, на котором находится объект (n стекла = 1,5).

В целом микроскопический объект может рассматриваться в трех типах системы: сухой - между линзой объектива и объектом находится воздух ($n = 1$); водной - между линзой объектива и объектом находится капля воды ($n = 1,3$) - водная иммерсия; масляной - линза объектива

погружается в каплю иммерсионного масла - кедрового, касторового, вазелинового ($n = 1,52$) - масляная иммерсия.

При микроскопии в дневное время можно пользоваться естественным светом, однако, чаще прибегают к источникам искусственного света, которые обеспечивают интенсивное регулируемое освещение (осветители типа ОИ - 19, ОИ - 35). При установке света конденсор должен быть поднят до упора, ирисовая диафрагма открыта; настройка освещения производится с объективом малого увеличения (8х). Объектив опускают на расстояние около 0,8 см от предметного стекла и, вращая зеркало, добиваются равномерного и яркого освещения.

Яркость освещения следует регулировать только изменением накала лампы осветителя или применением светофильтров. Положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не изменять. Диафрагмой конденсора можно пользоваться только для изменения контрастности изображения.

На предметный столик помещают препарат, закрепляют его боковыми зажимами и изучают сначала с объективом 8х. Для детального изучения препарата пользуются объективом 40х, осуществляя фокусировку только микровинтом. После просмотра препарата переводят револьвер на увеличение 8х и только после этого снимают препарат с предметного столика. Микроскоп в нерабочем состоянии должен находиться на увеличении 8х.

Высокая разрешающая способность современных **электронных микроскопов** (15-10-5А и даже 3 и 1,5 А) позволяет наблюдать и изучать объекты, невидимые в световом микроскопе: вирусы, фаги, микоплазмы, тонкое строение клеток прокариот и эукариот, их макро- и микроструктурные элементы, другие субмикроскопические органеллы.

Электронный микроскоп состоит из нескольких сложных узлов: колонные, в которой находятся осветительная система (электронная пушка и конденсорная линза), камера объекта (предметный столик, объективная, промежуточная и проекционная линзы), экран, фотокамера; вакуумной системы; установки для электропитания, размещенной в металлическом шкафу за колонной; вспомогательных устройств (рис. 8).

Принцип ЭМ. В качестве источника электронных лучей применяют электронную пушку, основой которой служит вольфрамовая нить, нагретая электрическим током (рис. 9). Электронные лучи обладают малой длиной волны. Прохождение электронных лучей в

вакууме через электромагнитные поля, создаваемые электромагнитными линзами, концентрирует и направляет электронный поток. Это обеспечивает резкое повышение разрешающей способности электронного микроскопа до 0,2 нм и увеличение до 10^9 .

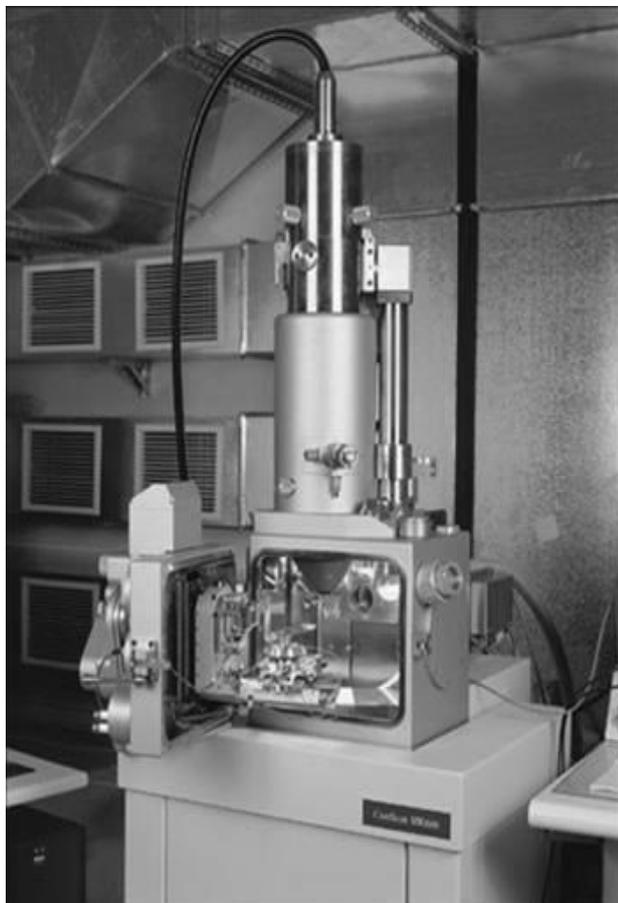


Рисунок 8 – Электронный микроскоп

Препараты для электронной микроскопии должны быть прозрачными и прочными. Их готовят на специальных тончайших пленках – подложках из коллодия. Толщина пленок около 1 мкм. Для их получения пользуются 0,5-2%-ным раствором коллодия в амилацетате. Пленки осторожно укладывают на опорную металлическую сетку с очень мелкими ячейками (4-10 ячеек на 1 мм). Приготавливают препарат, тщательно промывают его дистиллированной водой от посторонних примесей (остатков среды, солей), сушат, напыляют металлом (хромом) или контрастируют фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранилацетатом и др. Для изучения структуры клеток, выявления локализации вирусов после обработки готовят тонкие срезы на специальных ультрамикротоммах. Следовательно, в электронных микроскопах

микроорганизмы исследуют не в живом состоянии, а в виде фиксированных препаратов.

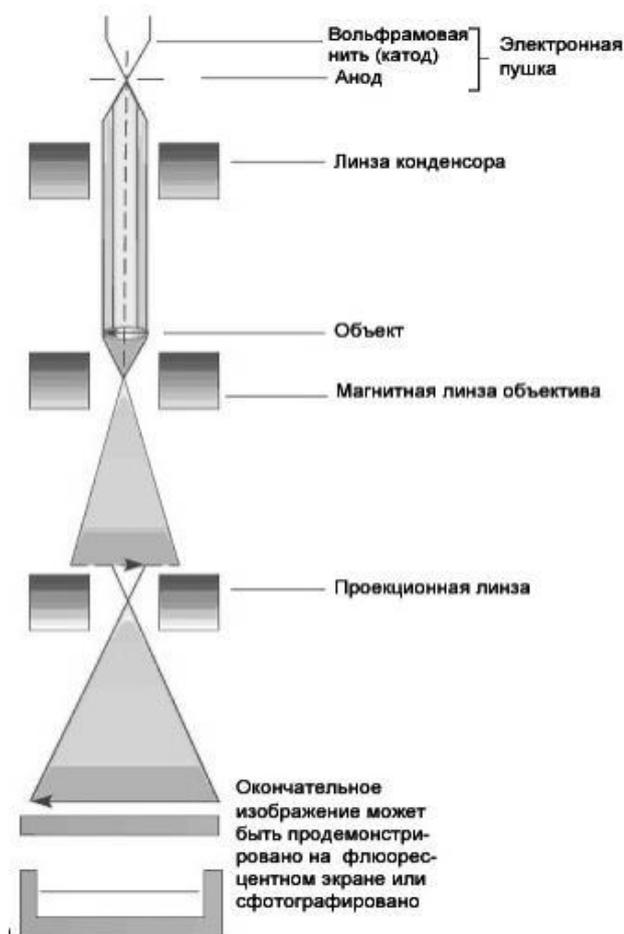


Рисунок 9 – Схема электронного микроскопа

В **трансмиссионных** микроскопах электроны проходят через образец, затем собираются и фокусируются электромагнитными линзами. Электроны невидимы для глаза, поэтому они направляются на флуоресцентный экран, который воспроизводит видимое плоскостное изображение, или на фотоплёнку, чтобы получить постоянный снимок (электронную микрофотографию). Проходя через объект, части которого имеют различную толщину, электроны больше или меньше задерживаются, а объект приобретает контрастность. Создаёт изображение только та часть электронов, которая проходит через объект и попадает на экран микроскопа. Участки клеток, слабо рассеивающие электроны, выглядят на экране светлыми, а участки, сильно рассеивающие электроны, тёмными.

В **сканирующих** электронных микроскопах пучок электронов фокусируется в тонком зонде и им сканируют образец, а отраженные от поверхности образца электроны собираются и формируют на экране

объемное изображение. При сканирующей электронной микроскопии изучают поверхность различных объектов, напыляя на них в вакуумной камере электронно-плотные вещества, и исследуют реплики, повторяющие контуры образца.

Заполните таблицу 2.

Таблица 2

Сравнение электронного и светового микроскопов

| Параметр | Электронный микроскоп | Световой микроскоп |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Источник излучения | | |
| Длина волны | | |
| Максимальное полезное увеличение | | |
| Максимальное разрешение | | |
| Линзы | | |
| Объект | | |
| Красители | | |

Контрольные вопросы:

1. Назовите и охарактеризуйте наиболее распространенные микроскопы.
2. Назовите основные части светового микроскопа микроскопа.
3. Устройство электронного микроскопа.
4. Приготовление препаратов для электронной микроскопии.

Лабораторная работа № 7

Устройство автоклава. Правила упаковки посуды для стерилизации. Стерилизация питательных сред

Цель занятия: ознакомиться с принципом работы и устройством автоклава. Получить представление о стерилизации текучим паром и принципах подготовки материалов для стерилизации безопасности при работе с прибором под давлением.

Порядок выполнения лабораторной работы:

1. Изучить конструкцию и принцип работы автоклава.
2. Изучить требования к стеклянной посуде лаборатории.
3. Приготовить ватные пробки.

4. Законспектировать правила подготовки посуды и материалов к стерилизации в автоклаве (табл. 3).

5. Ответить на контрольные вопросы.

Автоклавы служат для стерилизации посуды, питательных сред и других материалов насыщенным паром под давлением выше атмосферного. Автоклавы бывают разных конструкций (вертикальные, горизонтальные), но принципиальная схема их устройства одинакова (рис. 10, 11).

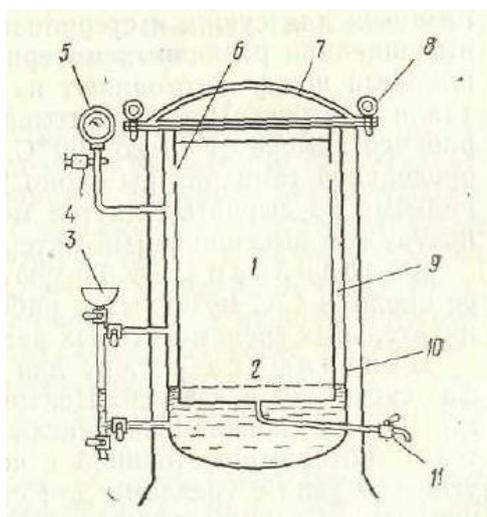


Рисунок 10 – Схема устройства вертикального автоклава: 1- камера стерилизации, 2 – подставка для размещения стерилизуемых материалов, 3 – воронка для заполнения автоклава водой; 4- клапан предохранительный, 5 – манометр, 6 – отверстие для поступления пара в камеру стерилизации, 7 – крышка, 8- зажимы винтовые, 9 – камера водопаровая, 10 – котел, 11- кран для спуска воды

Принцип действия автоклава основан на возрастании температуры кипения воды при повышении давления (при давлении в 1 атм t° кипения воды 99,1С, а при давлении в 2 атм. – 119,6С). Автоклавы бывают стационарные и переносные, горизонтальные и вертикальные. Воду в автоклаве нагревают для образования пара при помощи электрической энергии. Основные части автоклава: кожух, водопаровая камера, стерилизационная камера, крышка с резиновой прокладкой. Водопаровая камера из специальной высококачественной; стали предназначена для получения пара. Предназначенный для стерилизации

материал помещают в стерилизационную камеру. Массивная крышка с резиновой прокладкой наглухо закрывает водопаровую камеру. Крышку к корпусу прикрепляют болтами и сверху зажимают барашковыми гайками.

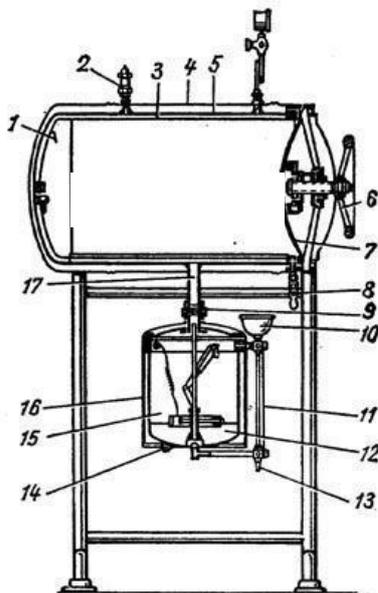


Рисунок 11 – Горизонтальный автоклав АЭ-31:1 – отражатель; 2 – предохранительный клапан; 3 – стерилизационная камера; 4 и 16 – кожухи; 5 – паровая камера; 6 – штурвал; 7 – крышка; 8 – спускной кран; 9 – накидная гайка; 10 – воронка; 11 – водомерная стеклянная трубка; 12 – электронагреватель; 13 – кран водомерной трубки; 14 – болт заземления; 15 – котелок; 17 – патрубок.

Наружный кожух предохраняет автоклав от механических повреждений. В современных электрических автоклавах система подачи нагретого пара отделена от стерилизационной камеры. Пар подается в стерилизационную камеру через патрубок от котелка, снабженного электронагревательным элементом с регулятором степени нагрева. К автоклаву прилагается арматура: манометр с сифонной трубкой и трехходовым краном, водомерная стеклянная трубка для измерения уровня воды в водопаровой камере автоклава, предохранительный клапан для предупреждения чрезмерного повышения давления в автоклаве, воздушный и спускной краны для удаления воздуха в начале стерилизации и для удаления конденсата из стерилизационной камеры. Персонал, обслуживающий автоклав, должен быть подготовлен на специальных курсах. Квалификационная комиссия в присутствии инспектора

котлонадзора выдает удостоверения на право эксплуатации автоклава. При неумелой работе с автоклавом может произойти взрыв. Пользоваться автоклавом запрещается, если: а) истек срок осмотра автоклава инженером-теплотехником; б) обнаружен хотя бы один неисправный зажимный болт; в) повреждено хотя бы одно ушко крышки автоклава; г) испорчен манометр, предохранительный клапан или стекло водомерной трубки; д) не произведена в установленный срок очистка автоклав от накипи и грязи; е) замечена течь котла. Перед тем как приступить к эксплуатации автоклава, необходимо проверить его комплектность и изучить прилагаемую к автоклаву инструкцию.

Надо учитывать, что показание манометра соответствует определенной температуре пара в автоклаве: 0,50 МПа - 112 °С, 0,1 МПа - 120, 0,15 МПа - 127, 0,2 МПа - 134 °С.

Материал в автоклаве чаще всего стерилизуют при 0,1 МПа в течение 20-30 мин. По окончании стерилизации отключают источник нагрева (стрелка манометра постепенно доходит до нуля). После этого открывают паропроводный кран, выпускают остаток пара. Затем осторожно отвинчивают крышку и открывают ее. После полного остывания вынимают простерилизованный материал.

В автоклаве можно стерилизовать посуду, инструменты, питательные среды (кроме желатина и сред с углеводами) и т. п. При работе необходимо соблюдать правила техники безопасности. К работе допускают лиц, имеющих удостоверение на право пользования автоклавом. Исправность автоклава проверяет инспекция котлонадзора.

Аппарат Коха – это металлический цилиндр, обшитый снаружи материалом (линолеум, асбест), плохо проводящим тепло. На дно наливают воду, а стерилизуемый материал помещают сверху на подставку. Аппарат закрывают конической крышкой, в которой имеются отверстия для термометра и выхода пара. Внизу расположен кран для спуска воды. Стерилизацию проводят текучим паром при 100°С в течение 30-60 мин. При таком режиме погибают вегетативные клетки спорообразующих и неспорообразующих форм микробов. Дробная стерилизация (трехкратная) по 30-60 мин в течение трех дней с интервалом 18-20 ч позволяет создать условия для прорастания спор в вегетативные клетки и освободиться от них. В промежутки времени между стерилизацией споры прорастают и при последующем прогревании погибают. В аппарате Коха стерилизуют те материалы, которые не выдерживают температуру выше 100°С (желатин, молоко, углеводные среды и др.).

Для лабораторных биотехнологических исследований необходима различная стеклянная посуда. Чашки Петри (диаметр 10 см, высота 1,5 см) применяют для выделения чистых культур, количественного учета микроорганизмов, анализа микрофлоры на плотных питательных средах и других исследований; колбы Виноградского, плоские бутыли-матрацы, качалочные колбы для выращивания аэробных микроорганизмов, пробирки и колбы с поплавками – для изучения процессов брожения. Кроме специальной микробиологической посуды широко используют обычную химическую посуду: колбы плоскодонные конические Эрленмейера, круглодонные, мерные (на 25, 50, 100, 200 мл); пипетки градуированные (на 1, 2, 5, 10 мл), пипетки Мора (на 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100 мл), пастеровские пипетки с оттянутым капилляром, пробирки биологические (без ранта) 18x2,0; 18x1,5; 15x1,5 см; бюретки, капельницы, воронки, мензурки, цилиндры, бюксы, склянки.

Колбы и пробирки, используемые для приготовления и стерилизации питательных сред и выращивания культур микроорганизмов, закрывают ватными пробками (рис. 12). Пробки изготовляют вручную или при помощи специальной машины.

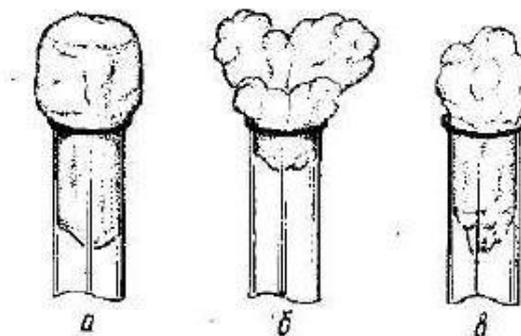


Рисунок 12 – Выполнение ватных пробок: а – правильно; б, в – неправильно

Правильно подготовленная к стерилизации лабораторная посуда, инструментарий, питательные среды предупреждает их загрязнение микрофлорой воздуха при хранении и использовании. Подготовленные лабораторные материалы до стерилизации следует хранить в чистых коробках или ящиках столов, выложенных фильтровальной бумагой. Сверху подготовленные материалы также следует прикрыть бумагой.

Способы подготовки посуды и материалов к стерилизации в автоклаве приведены в табл. 3.

Таблица 3 – Подготовка лабораторной посуды и инструментария к стерилизации

| Наименование изделий | Способы подготовки |
|-----------------------------------|---|
| Чашки Петри | Упаковывают в оберточную бумагу по одной или 5-6 штук. Можно укладывать в металлические пеналы специального назначения. Бумага, используемая для упаковки лабораторных изделий, не должна разрушаться при стерилизации. К применению разрешена бумага мешочная непропитанная, пергамент. |
| Пипетки стеклянные градуированные | Пипетки по одной или несколько штук заворачивают в длинные полоски бумаги шириной 4-5 см., на поверхности которой отмечают объем завернутой пипетки. Пипетки можно укладывать в металлические пеналы. |
| Лабораторный инструментарий | Шпатели для посева, пинцеты, ножницы заворачивают по одному или несколько штук в оберточную бумагу или упаковывают в двойные мягкие упаковки из бязи. Ватные тампоны из медицинской ваты монтируют в пробирки с ватно-марлевыми или ватными пробками, или упаковывают в бумагу по несколько штук. |
| Флаконы, бутылки, пробирки, колбы | Закрывают силиконовым или ватно-марлевыми, которые должны входить в горлышко сосуда на 2/3 своей длины. Поверх пробки (кроме пробирок) надевают бумажный колпачок, который обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым кольцом. Пробирки связывают по 5 и более штук и обертывают поверх пробок бумагой. |
| Емкость для забора материала | Закрывают двойной пергаментной бумагой и обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым кольцом. |
| Питательные среды | Закрывают силиконовыми или ватно-марлевыми, которые должны входить в горлышко сосуда на 2/3 своей длины. Поверх пробки (кроме пробирок) надевают бумажный колпачок, который обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым кольцом. |
| Спецодежда | Укладывают в стерилизационные коробки или упаковывают в двойные мягкие упаковки из бязи. |

Контрольные вопросы:

1. Объясните принцип работы автоклава.
2. Чем отличается принцип автоклавирования от стерилизации в аппарате Коха?
3. Укажите правила подготовки посуды к стерилизации.

Лабораторная работа № 8

Термостат, его устройство и назначение. Назначение и устройство сухожарового шкафа

Цель занятия: ознакомиться с принципом работы и устройством термостата и сушильного шкафа. Получить представление о требованиях безопасности при работе с электрическими приборами.

Порядок выполнения лабораторной работы:

1. Изучить конструкцию и принцип работы электрического термостата.
2. Изучить конструкцию и принцип работы сухожарового и сушильного шкафов.
4. Заполнить таблицу 4.
5. Ответить на контрольные вопросы.

При проведении лабораторных исследований зачастую возникает необходимость в обеспечении и высокоточном поддержании заданной температуры рассматриваемого объекта. Для этих целей в помещении монтируют особое регулирующее устройство, **термостат лабораторный**.

Термостаты предназначены для выращивания микроорганизмов на питательных средах при постоянной заданной температуре. В лабораториях устанавливают несколько термостатов с разной температурой, благоприятной для развития отдельных групп микроорганизмов: мезофиллов – 28-30 °С, термофилов – 43-55, патогенных видов – 37 °С. Термостаты бывают различной формы, размеров и конструкций: от небольшого шкафчика до термостата с несколькими отделениями или отдельной термостатной комнаты.

Термостат (рис. 13) представляет собой металлический шкаф с двойными стенками, между которыми находится слой воды или воздуха. Наружная часть термостата покрыта материалом, плохо проводящим тепло (асбест, линолеум).

Внутри термостата расположены полки для размещения посевного материала выращиваемых микроорганизмов. Постоянную температуру в термостате поддерживают с помощью терморегулятора, который вмонтирован в верхнюю крышку термостата. Устройство терморегулятора основано на принципе линейного расширения веществ. Терморегуляторы представляют собой сплав каких-либо двух металлов с различным коэффициентом теплового расширения (латунь, цинк) или металлическую "подушку", наполненную спиртом, смесью

спирта и эфира, ртутью или другими веществами, изменяющими свой объем при определенной температуре. При нагревании термостата выше установленной нормы металлы расширяются, контакты размыкаются и дальнейший приток тепла автоматически задерживается. После снижения температуры включается электрический ток и приток тепла возобновляется.



Рисунок 13 – Термостат воздушный

Температура воздуха в данной конкретной части помещения, где стоит термостат, должна быть максимально ограждена от влияния таких посторонних факторов, как тепло от ламп накаливания или радиатора отопления и не подвергаться прямому воздействию солнечных лучей. Встроенные в прибор датчики очень чутко реагируют на любое изменение температуры, включая либо отключая подачу энергии на кондиционер или печь для достижения заранее установленных значений.

Требования, предъявляемые современной биотехнологией, обусловили появление на рынке термостатов, обладающих самыми разнообразными характеристиками и особенностями функционирования. На данный момент все аппараты данного типа поддаются классификации по нескольким основным параметрам:

1. по диапазону рабочих температур (высоких, средних и низких);
2. по теплоносителю (жидкостные, воздушные и твердотельные);
3. по точности поддержания работы;
4. по области применения (промышленные, лабораторные и пр.).

С учётом совокупности характеристик, среди которых стоимость занимает не последнее место, наибольшей популярностью пользуется **термостат воздушный лабораторный**. Производители предлагают множество моделей, основанных на общем принципе действия, но основное деление происходит по двум веткам: термошкафы и хладотермостаты. Независимо от целей термостатирования, и те и другие способны обеспечить поддержание температуры в установленном рабочем диапазоне, независимо от колебаний факторов среды. Внешне воздушные термостаты напоминают сушильные шкафы. Существующие образцы, как правило, оснащены электрическим или газовым обогревом, термометрами и терморегуляторами. Они достаточно широко применяются как при постоянных температурах разделения, так и для программированных анализов. Их способность к поддержанию стабильных условий внутри рабочего объёма активно используется при проведении разного рода микробиологических, санитарно-бактериологических, вирусологических и биохимических исследований. Преимущество вышеописанных агрегатов над всеми остальными подобного класса состоит в меньшей инерционности и лёгкости в эксплуатации и обслуживании.

Лабораторные **жидкостные термостаты** тоже имеют ряд неоспоримых преимуществ, основное из которых, пожалуй, - очень хорошая тепловая стабильность. Именно от требуемого диапазона и будет зависеть выбор рабочего тела (жидкости) для устройства. Лучшей признана дистиллированная вода, с той оговоркой, что диапазон поддерживаемых ею температур весьма ограничен (от 5 °С до 95 °С). Второе место уверенно занимают силиконовые масла (от -80 °С до 350 °С), хотя их повседневное использование признано экономически не выгодным в силу определённых причин (изменение показателей вязкости, вредные испарения, полимеризация, отвердевание и т.п.). И, наконец, последним по счёту, идёт простой этиловый спирт, весьма эффективно применяемый в криотермостатах (- 60 °С до 0 °С).

Сухожаровой шкаф или воздушный стерилизатор – наиболее простой и эффективный метод стерилизации медицинских принадлежностей, позволяющий сохранить их целостность и физические свойства.

Принцип работы устройства основан на циркуляции горячего воздуха внутри камеры из нержавеющей стали или другого термостойкого материала. Стерилизующим агентом в данном случае является

сухое тепло, обладающее превосходными проникающими свойствами практически для любых материалов.

Процесс стерилизации в сухожаровом шкафу практически не требует участия человека. Для стерилизации требуется задать время и температуру, или (в некоторых моделях) выбрать нужную программу. Все остальное выполняется в автоматическом режиме.

Благодаря специальной системе вентиляции воздух в камере прогревается быстро и равномерно, что способствует сохранности стерилизуемых предметов.

Управляющая система на основе микроконтроллеров поддерживает стабильную температуру на протяжении всего процесса стерилизации, не допуская колебаний температуры или перегрева.

Помимо микропроцессорной системы контроля температуры, медицинские сухожаровые шкафы снабжаются резервной схемой на основе термостата, работающей независимо от основной системы.

Простота конструкции медицинского воздушного стерилизатора обеспечивает идеальную дезинфекцию, а также быструю и эффективную очистку камеры.

Некоторые модели имеют возможность подключения к персональному компьютеру для документирования процесса стерилизации или корректировки параметров.

Стерилизовать предметы можно как в упаковке, так и без нее в решетчатых емкостях. Эффективность стерилизации напрямую зависит от свободного доступа воздуха к обрабатываемым предметам, поэтому необходимо соблюдать правильную загрузку камеры.

В отличие от пара, используемого для стерилизации автоклавами, горячий сухой воздух в сухожаре исключает коррозию металлических инструментов и эрозию стеклянных поверхностей. По цене воздушные сухожаровые шкафы значительно дешевле автоклавов. Также ниже затраты на их использование.

К недостаткам воздушных стерилизаторов по сравнению с автоклавами можно отнести более высокие температуры, используемые в сухожарах. Этот факт сокращает номенклатуру стерилизуемых изделий. Исключаются: резина, текстиль, полимеры и другие принадлежности, не выдерживающие высоких температур. Ограничивается и перечень упаковочных материалов. Исключается бумага, пергамент, непропитанная бязь и некоторые другие. Перед стерилизацией следует обязательно убедиться, что предметы являются термостойкими.

Независимо от формы, круглой или прямоугольной, все сухожаровые шкафы состоят из нескольких основных узлов (рис. 14):

- Корпус шкафа оборудуется надежной теплоизоляцией и электроконтактными термометрами для автоматического контроля температуры внутри камеры.
- Стерилизационная камера, нагревание которой обычно осуществляется электронагревательным элементом.
- Внутри камера оборудована загрузочными сетками для удобного и рационального размещения стерилизуемых предметов.
- Крышка с блокировкой от произвольного открывания.
- Подставка с вмонтированным реле времени, шкалой отсчета и сигнальными лампами для удобного контроля за процессом стерилизации.



Рисунок 14 – Сухожаровой шкаф

Кроме невысокой стоимости **воздушные стерилизаторы** привлекают простотой в обслуживании и эксплуатации. Их можно устанавливать в помещениях без дополнительной установки вентиляционных устройств.

Загруженный аппарат нагревается до желаемой температуры с учетом прогрева самого устройства и загруженного в камеру материала. Чаще всего температура сухого воздуха доводится до уровня 180 градусов, а сама процедура обеззараживания длится 60 минут. Допустимым считается колебания температуры в 11 – 14 градусов. Чем больше объем камеры, тем большими могут быть отклонения температурного режима. Временные отклонения не должны превышать 5 минут. Современные модификации сухожаровых шкафов обеспечивают два режима.

- 1 час при температуре 180 градусов.
- 2 часа при температуре 160 градусов.

Обработка медицинского оборудования в упаковке позволяет использовать их в течение 3 суток. Инструменты без упаковки используются сразу же после стерилизации. В качестве упаковочного материала в сухожарах используют влагопрочную непроницаемую бумагу. Пакеты для игл или шприцев склеивают поливиниловым спиртом или крахмальным клеем.

Сушильный шкаф (рис. 15) с терморегулятором предназначен для сушки и стерилизации лабораторной посуды, для высушивания различных материалов до постоянной массы. Сушильный шкаф изготавливают из термостойких материалов (металла и асбеста) и рассчитывают на диапазон температур в рабочей камере от 40 до 200 °С. Длительность разогревания до предельной температуры около 1,5 ч. Внутри шкаф оборудован полками из дырчатых листов металла, на которых размещают посуду или высушиваемый материал.

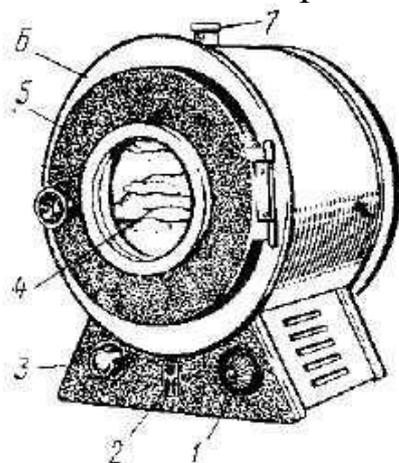


Рисунок 15 – Сушильный шкаф: 1 – рукоятка терморегулятора со шкалой, 2 – выключатель, 3 – сигнальная лампа, 4 – подставка, 5- дверца, 6 – корпус, 7 – отверстие для термометра и вентиляционный колпачок

Изучите имеющиеся в лаборатории биотехнологии термостаты, сушильные и сухожаровые шкафы. Заполните таблицу 4.

Таблица 4

Особенности конструкции, модели и назначение приборов лаборатории биотехнологии

| Прибор | Модель | Устройство | Назначение |
|--------|--------|------------|------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Контрольные вопросы:

1. Объясните назначение термостата.
2. В чем преимущества воздушных и водяных термостатов.
3. Принципы обслуживания термостата.
4. Назначение и устройство сухожарового шкафа. Отличия стерилизации воздухом от стерилизации паром.

Лабораторная работа № 9

Получение трансгенных животных

Цель занятия: ознакомиться с технологиями создания трансгенных животных.

Порядок выполнения лабораторной работы:

1. Законспектируйте информацию о трансгенных животных.
2. Заполните таблицу 5.
3. Составьте схему-классификацию технологий создания трансгенных животных.
4. Ответьте на контрольные вопросы.

Трансгенез – это процесс переноса и интеграции чужеродной генетической информации в геном живого.

Трансгенные животные – это животные, которые получены в результате переноса в их геном чужеродных генов от других видов животных или человека.

Генетическая инженерия животных — наиболее сложное из всех биотехнологических направлений. Это связано с отсутствием у всех позвоночных животных бесполого размножения, а у млекопитающих — еще и с невозможностью развития потомства вне материнского организма. Однако биотехнология XXI в. сумела преодолеть эти трудности.

В настоящее время разработаны методы введения дополнительной генетической информации в клетки практически любых организмов. Но получить трансгенное млекопитающее удастся только с использованием сложных методологических подходов. Наиболее успешным является *метод микроинъекций в мужской пронуклеус*.

Для осуществления микроинъекций используют клетки, полученные сразу после слияния яйцеклетки и сперматозоида.

У млекопитающих после слияния половых клеток в течение нескольких часов ядра сперматозоида и яйцеклетки (мужской и женский пронуклеусы соответственно) остаются не слившимися. В мужской пронуклеус с помощью специального прибора вводят молекулы ДНК, содержащие нужные гены. Через некоторое время происходит слияние пронуклеусов, и зигота начинает делиться. Такие зиготы вводятся в матку специально подготовленной самки (суррогатной матери). Через положенный для вынашивания плода срок рождается трансгенный детеныш. Таким способом можно получить трансгенное животное практически любого вида млекопитающих.

Трансгенных животных получают для научных и практических целей. В частности, на лабораторных трансгенных мышах созданы модели целого ряда наследственных заболеваний человека. На таких животных отрабатываются возможные пути предотвращения этих заболеваний и оказания медицинской помощи болеющим.

Некоторые белки человека не удастся нарабатывать с использованием бактерий, грибов или культур клеток животных. В этом случае методом микроинъекций можно получить животное, в молоке которого будет содержаться белок медицинского назначения (рис. 42-1.1). Примером может служить один из факторов свертывания крови человека, который необходимо периодически вводить больным гемофилией. По расчетам ученых, стадо трансгенных животных (например, овец) с численностью около сотни особей будет способно обеспечить необходимым белком всех гемофиликов мира. Таких животных называют *животными-биореакторами*.



Для решения проблемы создания таких стад разработан и испытывается метод клонирования животных (не путать с уже известным вам клонированием генов). Так как получение каждого трансгенного животного с нужными свойствами представляет собой сложную задачу, предполагается получать точные генетические копии (клоны) однажды полученных особей. Это можно сделать согласно следующей схеме (рис. 42-1.2).

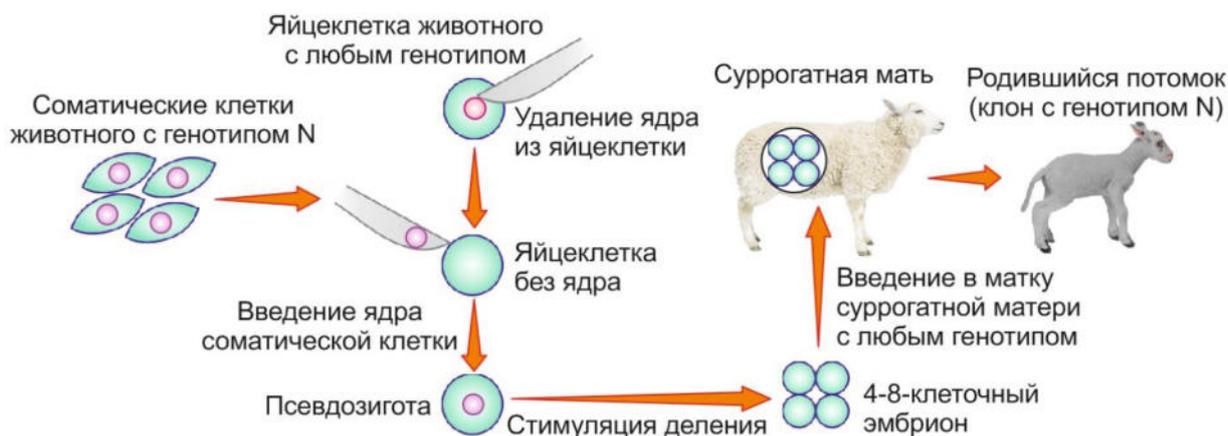


Рис. 42-1.2. Схема клонирования овцы с генотипом N

С помощью специального прибора из яйцеклетки извлекают ее ядро. Затем в нее вводят ядро соматической клетки того животного, которое надо клонировать. Создают условия, при которых такая бывшая яйцеклетка (а теперь псевдозигота), начнет делиться. Как известно, деление зиготы (дробление) — это начало развития эмбриона. Такие эмбрионы переносят в матку суррогатной матери. При удачной трансплантации в стенку матки эмбрион будет развиваться, как обычный плод. В результате родится детеныш — точная генетическая копия того организма, из клетки которого было взято ядро.

Клонировать можно (и нужно!) не только трансгенных животных. В современном животноводстве давно и успешно применяется искусственное осеменение. Для получения высокопродуктивных животных определенной породы используется сперма самцов-производителей. Во множестве хозяйств такой спермой искусственно оплодотворяют половозрелых самок.

Производителями называют тех животных, в генотипе которых обязательно (и желательно в гомозиготном состоянии) присутствуют

гены, которые определяют основные породные признаки. Потомки, получаемые от таких производителей, наследуют только половину их высокоценного генотипа. Клонирование же такого производителя может дать точную копию, сохраняющую весь генотип.*

Животных-производителей определенной породы получают путем многолетней селекции, поэтому их ценность огромна. Например, в 2019 г. на аукционе в штате Северная Дакота (США) одного из племенных быков продали за 1,51 млн долларов.

В рамках генетической инженерии животных ведутся работы не только по млекопитающим. Разрабатываются более эффективные методы получения трансгенных птиц и рыб.

В селекционной работе с сельскохозяйственной птицей основными направлениями являются получение пород с улучшенным составом мяса и яиц, а также пород, устойчивых к инфекционным заболеваниям. Проводятся эксперименты по созданию птиц-биореакторов, в яйцах которых белок птичий альбумин был бы частично заменен на белок медицинского или ветеринарного назначения.

Для выведения пород рыб также используются методы генетической инженерии. Один из проектов данного направления уже реализован. В геном атлантического лосося был введен ген гормона роста одного из видов тихоокеанского лосося. Результатом этого стало создание лосося, растущего в 2 раза быстрее, чем рыбы исходной породы (рис. 42-1.3). Еще одним достижением генетической инженерии рыб стало создание пород светящихся в темноте аквариумных рыбок. Для этого были использованы гены медуз и кораллов, которые кодируют светящиеся белки разных цветов (рис. 42-1.4).



Рис 42-1.3. Особи лосося одного возраста исходной и трансгенной пород



Рис 42-1.4. Трансгенные аквариумные рыбки

Гены, которые используются для переноса, выделяют из определенного генома или синтезируют искусственно. В мировой практике уже получены трансгенные животные, продуцирующие с молоком целый ряд лекарственных веществ:

- факторы свёртываемости крови против гемофилии;
- человеческий белок С для предотвращения образования тромбов;
- моноклональные антитела для лечения различных форм рака.

Получение трансгенных животных включает следующие стадии:

1. Создание генной конструкции (выбор, получение и клонирование чужеродного гена).

2. Внедрение ее в геном организма путем микроинъекции гена в мужской пронуклеус, трансплантация зиготы реципиенту.

3. Селекция модифицированных организмов.

Трансгенные мыши получены методом микроинъекции яйцеклетки самок-доноров. В мужской пронуклеус вводят трансген. Имплантируют самке – суррогатной матери, которая рождает трансгенное потомство – основателей трансгенных линий.

Создание трансгенных коров:

1. Сбор ооцитов коров, забитых на скотобойне.
2. Созревание ооцитов *in vitro*.
3. Оплодотворение бычьей спермой *in vitro*.
4. Центрифугирование оплодотворенных яйцеклеток для концентрирования желтка.
5. Микроинъекция ДНК в мужской пронуклеус.
6. Развитие эмбрионов *in vitro*.
7. Нехирургическая имплантация одного эмбриона реципиентной самке во время течки.
8. Скрининг ДНК потомков на наличие трансгена.

Трансгенные животные важны для различных биомедицинских исследований. Существует множество трансгенных животных, моделирующих различные заболевания человека (рак, атеросклероз, ожирение и др.). В практических целях трансгенные животные используются различными зарубежными фирмами как коммерческие биореакторы, обеспечивающие производство разнообразных медицинских препаратов (антибиотиков, факторов свертываемости крови и др.).

Таблица 5 –

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Контрольные вопросы:

Лабораторная работа № 10

Трансплантация эмбрионов КРС

Цель занятия:

Порядок выполнения лабораторной работы:

Трансплантация эмбрионов — прогрессивный метод улучшения породных и продуктивных качеств животных, позволяющий получить потомство с улучшенными генетическими свойствами, существенно увеличив поголовье высокоценного скота. Оплодотворенные яйцеклетки (зиготы, эмбрионы) получают от генетически ценной коровы, на седьмой день после её осеменения, до прикрепления эмбриона к стенке матки. Эмбрион пересаживают в матку коровы-реципиента, которая служит в качестве «суррогатной матери» и не имеет ценных породных свойств. В случае, если пересадка окажется результативной и эмбрион приживётся, то по истечении нескольких месяцев беременности на свет появляется новорожденное животное, значительно превосходящее реципиента по своему генетическому потенциалу.

Требования к животным донорам и реципиентам.

В качестве доноров эмбрионов используют телок или коров, обладающих высокоценным генетическим и породным потенциалом, в возрасте от 14 месяцев. Коров можно использовать для трансплантации после отела (но не ранее, чем через 2 месяца) и окончания послеродового периода, когда матка полностью восстановилась и возобновились половые циклы. В качестве доноров используют самых ценных и качественных племенных животных. Качество донора определяется по таким критериям, как племенная ценность, количество и качество молочной продукции, экстерьер, общее развитие, полноценный половой цикл и т. д. Рекомендуют проводить отбор животных для трансплантации эмбрионов с учетом дополнительных критериев, отражающих гормональный статус и метаболическую активность потенциальных доноров. При этом практическое значение имеет способность донора к множественной овуляции, к получению от него жизнеспособных эмбрионов.

Считают, что для получения от донора не менее 10 овуляций и 6 жизнеспособных эмбрионов необходимо, чтобы в нулевой день полового цикла в крови коров содержание эстрадиола было на уровне 15,4 пг/мл, тестостерона — 0,18 нг/мл, ЛГ — 1,46 МЕ/л. Уровень прогестерона на 10-й день полового цикла — от 2,0 до 5,0 нг/мл (в среднем 3,55) и ЛГ — 1,54 МЕ/л. Вызывание суперовуляции может быть

эффективным при содержании в крови холестерина не менее 3,55 ммоль/л, β -каротина — 8,88 мкмоль/л, витамина А — 4,36 мкмоль/л и активности аланинаминотрансферазы — не менее 0,24 мкмоль/л.

В качестве реципиента можно использовать животных любых пород, с учетом особенностей, отражающихся на размере и массе новорожденного. Коровам можно проводить трансплантацию эмбрионов после родов и окончания послеродового периода, на фоне восстановившихся половых циклов. Реципиентом может стать малоценное животное, не предназначенное для воспроизводства ремонтного молодняка. Для объективной оценки функциональной активности яичников животных-реципиентов и снижения эмбриональной смертности при трансплантации, проводят оценку качества желтых тел в яичнике. Учитывают также уровень гормонально-метаболического гомеостаза реципиентов, особенно- на 6–7 день естественного или индуцированного полового цикла. Пересадку эмбрионов рекомендуется проводить реципиентам с уровнем прогестерона в крови от 2,0 до 4,9 нг/мл, независимо от результатов оценки желтого тела. Соотношение прогестерона к эстрадиолу должно быть 1:10. В случае использования телок в качестве реципиентов с уровнем прогестерона свыше 5 нг/мл, приживляемость снижается на 10–17 %, ниже 2,0 нг/мл — на 25–30 %. Содержание холестерина должно быть в пределах от 2,60–3,90 мкмоль/л, β -каротина — 12,2–17,3 мкмоль/л.

Суперовуляция и пересадка эмбриона.

Цель гормональной стимуляции коров — получить из яичника вместо одной яйцеклетки максимальное количество половых клеток за одну овуляцию. Под влиянием фолликулостимулирующего гормона созревают множество яйцеклеток одновременно (суперовуляция). Созревшие яйцеклетки почти одновременно выбрасываются в яйцепровод, где происходит оплодотворение. Через неделю можно вымывать из матки коровы большое количество эмбрионов. Условием удачной трансплантации эмбрионов является соблюдение синхронности проявления половой охоты у доноров и реципиентов. Пересадка эмбриона реципиенту возможна лишь спустя одну неделю от начала половой охоты. Таким образом, происходит приживание эмбриона у реципиента и желтое тело функционирует. Эмбрион можно пересаживать в течение 6–8 дней после начала половой охоты реципиента, а при использовании замороженных эмбрионов срок от половой охоты до пересадки должен составлять одну неделю. Эффективная трансплантация эмбрионов возможна при соблюдении двух факторов: правильный

выбор оптимального времени для пересадки и синхронность полового цикла коровы-донора и коровы-реципиента. При этом необходимо внимательно отслеживать и учитывать признаки охоты.

Суперовуляция и синхронизация половых циклов.

Заблаговременно ветеринарным врачом планируется проведение программы по пересадке эмбрионов и предоставляются индивидуальные инструкции по каждой корове. За один день до начала гормональной обработки оценивают состояние матки и яичников животных. Если в яичниках коровы функционирует желтое тело, то можно начинать процесс трансплантации эмбрионов. Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) вводят в течение 4-х дней, два раза в сутки, утром и вечером, в понижающихся дозах с интервалом в 12 часов. Реципиентов обрабатывают простагландином на второй день после начала стимулирования суперовуляций у доноров. Донорам инъецируют простагландины на третий день вечером. Это делается потому, что половая охота быстрее проявляется у доноров с суперовуляцией, чем у реципиентов.

Осеменение.

На 6-й день от начала стимуляции суперовуляции реципиенты и доноры начинают входить в состояние охоты. Коров-доноров осеменяют искусственно два раза, с интервалом 9–15 часов, т. к. не все яйцеклетки созревают одновременно. При необходимости (при длительной охоте) осеменение повторяют 3-й раз. Наблюдение за признаками охоты осуществляют в течение нескольких дней. Проявление охоты у доноров и реципиентов происходит одновременно. Все признаки охоты тщательно фиксируют. Рефлекс неподвижности — самый важный признак готовности коров-реципиентов. Оптимальная синхронность половой охоты достигается в том случае, если разница по времени не больше 24-х часов. После осуществления осеменения доноров и наступления половой охоты у реципиентов делают перерыв на одну неделю. В этот период эмбрионы развиваются в матке донора.

Вымывание эмбрионов.

Эмбрионы извлекают из матки коровы-донора специальными катетерами через неделю после искусственного осеменения. Вымывание повторяют несколько раз. Одновременно производится массаж рога матки, с целью отделения всех эмбрионов от стенок матки. Жидкость с эмбрионами сливают в эмбриональный фильтр. После того, как один рог матки промыт, катетер переводится в другой рог матки и весь процесс повторяется. На следующем этапе производится поиск извлечённых эмбрионов в поле зрения микроскопа. Далее производится

классификация и разделение эмбрионов по категориям: I, II, III и IV. Для процесса трансплантации можно использовать свежеполученные эмбрионы категорий I, II и III. Для замораживания подходят только эмбрионы I категории. Эмбрионы IV категории не используют. После оценки эмбрионов производят ректальное исследование реципиентов, оценивают развитие желтых тел. Часть эмбрионов замораживают в криозащитной среде в сосудах, заполненных жидким азотом.

Пересадка эмбрионов.

Пересадку эмбрионов проводят с использованием специального катетера, введённого глубоко в рог матки. Трансплантация производится спустя одну неделю после начала половой охоты, при закрытой шейке матки, с соблюдением правил асептики. Пересадку коровам часто проводят на фоне эпидуральной анестезии, телкам вводят седативные препараты. Для пересадки можно использовать замороженные или свежеполученные эмбрионы. Трансплантация свежеполученных эмбрионов производится в день их вымывания из рогов матки коровы-донора, после оценки качества. В разных странах мира процент стельности реципиентов при использовании замороженных эмбрионов составляет от 45 до 65 %.

Проблемы трансплантации.

Приживаемость эмбрионов — одна из ведущих проблем, с которой сталкиваются специалисты при проведении трансплантации эмбрионов коровам-реципиентам. Нередко отмечается отторжение и гибель эмбриона в организме реципиента. Причины этого явления до конца не изучены, поэтому эффективность применения метода трансплантации в некоторых хозяйствах остается под вопросом. Затраты на лабораторное оборудование, инструменты, медикаменты и т. п., весьма значительны. Однако на последнем этапе работы всегда есть риск отторжения эмбриона. В связи с этим, по мнению многих авторов, особое внимание следует уделять подбору коров-реципиентов. Ведь именно от репродуктивного здоровья реципиентов зависит успех пересадки, приживаемость эмбрионов, здоровье будущего новорожденного теленка. Пересадка эмбриона самке с неизвестным характером и уровнем обменных процессов, без определения содержанием в крови половых гормонов и их соотношения проводится фактически вслепую, что экономически невыгодно. Для успешного выбора подходящего для трансплантации животного необходимо проводить подробную оценку состояния метаболизма его организма. В частности, необходимо определять содержание в крови эстрадиола, тестостерона, прогестерона,

лютеинизирующего гормона, холестерина, β -каротина, витамина А, активность аланин-аминотрансферазы и т. п. Известно, что показатели гормонального и метаболического гомеостаза позволяют с высокой степенью объективности оценить интенсивность обменных процессов, протекающих в организме самки-реципиента, позволяя распознать на ранних этапах эмбрионального развития целый ряд акушерских болезней и патологию развивающегося плода. Животным с риском развития перинатальной патологии сопутствуют нарушения гормонопродуцирующей функции фетоплацентарной системы, особенно на заключительном этапе беременности. Поэтому вполне возможно использование их для прогнозирования развития акушерской патологии на ранних этапах развития беременности и ее профилактики.

Трансплантация эмбрионов является современным эффективным методом, улучшающим породные и продуктивные качества поголовья крупного рогатого скота. Основная цель трансплантации — получить от высокоценного донора наибольшее количество телят, обладающих генетическим потенциалом матери. Главной задачей современных специалистов, работающих по проблеме трансплантации, является увеличение процента приживаемости эмбрионов, создание новых, простых в исполнении и недорогих схем пересадки, увеличение сроков хранения свежеполученных эмбрионов, усовершенствование криоконсервации и т. д. Для оценки состояния гормонально-метаболического гомеостаза организма коров — реципиентов многие ученые рекомендуют проводить определение в крови уровня эстрадиола, тестостерона, прогестерона, лютеинизирующего гормона, холестерина, β -каротина, витамина А, активности аланин — аминотрансферазы и т. п. Учитывая регулируемую роль, которую выполняют в период внутриутробного развития плода стероидные гормоны и другие биологически активные вещества, исследования крови необходимо проводить с прогностической и диагностической целью в отношении характера течения беременности, родов, послеродового периода и состояния новорожденных телят.

1. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота.

2. Способы извлечения оплодотворённых яйцеклеток из суперо-вулированных коров – доноров.
3. Хранение и пересадка эмбрионов.
4. Перспективы внедрения трансплантации эмбрионов.
5. Методы диагностики и профилактики микробной контаминации при трансплантации эмбрионов.
6. Группы крови и трансплантация эмбрионов.
7. Криоконсервирование эмбрионов.
8. Эффективность использования метода трансплантации эмбрионов в молочном скотоводстве.
9. Трансплантация эмбрионов в коневодстве.

Таблица 6 –

| | | |
|--|--|--|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Контрольные вопросы:

Лабораторная работа №11

Методы определения рН среды.

Цель работы: определение рН растворов кислот, оснований и солей различными методами (растворы индикаторов, универсальная индикаторная бумага).

Порядок выполнения работы:

1. Изучите теоретическую часть, законспектируйте основные понятия.
2. Определите рН предложенных растворов различными методами.
3. Ответьте на контрольные вопросы.

Существуют различные методы определения рН растворов. Одним из методов является колориметрический метод, основанный на применении реагентов, которые изменяют окраску в зависимости от концентрации ионов водорода. Такие реагенты называют кислотно-основными индикаторами. Они представляют собой слабые органические кислоты или основания, недиссоциированные молекулы и ионы которых имеют разную окраску при различных значениях рН. Интервал рН, в котором индикатор меняет свою окраску, называют интервалом рН перехода окраски индикатора.

Например, равновесия ионизации лакмуса и фенолфталеина в растворах могут быть представлены следующими схемами:

а) лакмус:

б) фенолфталеин:

Равновесие диссоциации индикатора может смещаться под действием кислот или оснований влево или вправо соответственно. Так, в растворе лакмуса в интервале значений рН от 0 до 5,0 (до интервала перехода) в растворе будет превалировать протонированная форма индикатора, и раствор окрасится в красный цвет. При $\text{pH} > 8,0$ (за интервалом перехода) в растворе в большем количестве присутствуют депротонированные частицы индикатора и раствор имеет синюю окраску. В интервале перехода и протонированная, и депротонированная формы индикатора присутствуют в соизмеримых количествах, поэтому раствор имеет промежуточную окраску, то есть фиолетовую. Сопоставляя действие исследуемого раствора на различные индикаторы нетрудно определить рН исследуемого раствора (см. табл. 7).

Таблица 7

Интервалы перехода окраски некоторых кислотно-основных индикаторов

| Индикатор | Интервал рН перехода окраски | Окраска до интервала перехода | Окраска в интервале перехода | Окраска за интервалом перехода |
|----------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| метилоранжевый | 3,1 – 4,4 | красный | оранжевый | оранжево-желтый |

| | | | | |
|----------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|
| метиловый красный | 4,4 – 6,2 | красный | оранжевый | желтый |
| лакмус | 5,0 – 8,0 | красный | фиолетовый | синий |
| фенолфта- леин | 8,0 – 9,8 | бесцветный | бледно-розо- вый | малиновый |

Для проведения эксперимента получите у преподавателя исследуемый раствор. Возьмите 4 пробирки. Поместите в каждую пробирку одинаковое количество (2-3 см³) раствора и добавьте по капле растворы имеющихся индикаторов. Отметьте цвет раствора в каждой пробирке. Результаты исследований оформите в виде таблицы. На основании полученных данных определите значение рН выданного раствора.

Таблица 8

Результаты исследования рН растворов

| Индикатор | Окраска исследуемого раствора | Порядок величины рН раствора | рН исследуемого раствора |
|--|-------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Метиловый оранжевый Метиловый красный Лакмус Фенолфталеин | | | |

рН исследуемого раствора можно определить не только с помощью индикатора, но и с помощью индикаторной бумаги, например, лакмусовой. Лакмусовая бумага представляет собой полоску фильтровальной бумаги, пропитанной раствором лакмуса, который предварительно подкрашивают добавлением очень малого количества кислоты (“красная лакмусовая бумага”) или щелочи (“синяя лакмусовая бумага”). Если при нанесении стеклянной палочкой на синюю лакмусовую бумагу капли исследуемого раствора она краснеет, то реакция раствора кислая. Посинение красной лакмусовой бумаги от капли исследуемого раствора показывает, что он имеет щелочную реакцию. Применение бумаги требует меньшей затраты раствора, однако окраски получатся менее яркими и, кроме того, несколько изменятся в связи с адсорбцией бумагой растворенных веществ.

Для проведения опыта стеклянной палочкой нанесите на полоску универсальной индикаторной бумаги 1-2 капли исследуемого раствора. Сразу же сравните окраску сырой бумаги с цветной шкалой.

Сделайте вывод о значении рН исследуемого раствора. Укажите реакцию его среды и вычислите концентрацию ионов водорода.

Контрольные вопросы:

1. Роль реакции среды в жизнедеятельности культур продуцентов.
2. Перечислите основные методы определения рН растворов.
3. Какие способы регулирования и коррекции рН среды Вам известны?
4. Что такое буферные растворы и какое применение они находят в биотехнологическом производстве?

Лабораторная работа № 12

Установки для поверхностного и глубинного культивирования микроорганизмов

Цель занятия: ознакомиться с технологиями получения грибного белка и функциональных продуктов на основе грибов.

Порядок выполнения лабораторной работы:

1. Законспектируйте основные понятия.
2. Заполните таблицу 9.
3. Ответьте на контрольные вопросы.

Биореактор, ферментер или ферментатор – это закрытая или открытая емкость, в которой при определенных условиях (давление, температура, концентрация сухих веществ, рН среды и т.д.) протекает на клеточном или молекулярном уровне контролируемая реакция, осуществляемая с помощью микроорганизмов.

Биореакторы (ферментаторы) составляют основу биотехнологического производства. Масса аппаратов, используемых, например, в микробной биотехнологии, различна, и требования здесь определяются большей частью экономическими соображениями. При масштабировании добиваются соответствия важнейших характеристик процесса, а не сохранения принципа конструкции.

Техническую вооруженность биотехнологических процессов целесообразно условно ограничить аппаратным оформлением производств, базирующихся на культивировании: 1) бактерий и грибов, 2) клеток и тканей растений, 3) клеток и тканей животных организмов и человека. Такое подразделение обусловлено тем, что бактерии и грибы в большинстве своем выращивают в однотипных биореакторах, имеющих почти однотипную обвязку, в которую входят: ферментатор,

многокорпусный вентиль стерильный (для подачи питательной среды, посевного материала, подпитки и пр.), системы регулирования рН, 1В°, подачи иеногасителя, система контроля расхода воздуха, пробоотборник, электродвигатель.

Растительные клетки, имеющие клеточную стенку (также как бактерии и грибы) растут, размножаются и развиваются значительно дольше, чем большинство бактерий и грибов, а это вносит определенные коррективы в аппаратурное оформление соответствующих биотехнологических процессов.

Культуры клеток животных и человека, не имеющие клеточных стенок, являются более ранимыми и требовательными к условиям своего существования, чем клетки других эукариот и прокариот. Поэтому оборудование для них можно отнести к разряду "тихоходного", обеспечивающего нежное обращение с биообъектами.

В отдельных случаях допустимы исключения, например, когда возможно культивирование в глубинных условиях некоторых растительных клеток (суспензионная культура женьшеня), используя ферментационное оборудование, рассчитанное на выращивание, например, бактерий или грибов.

К. Шюгерль в 1982 г. предложил подразделить биореакторы на 3 основные группы согласно способу потребления энергии для перемешивания и диспергирования г стерильного воздуха (газа):

- в биореакторах I типа энергия расходуется на механическое движение внутренних устройств;
- в биореакторах II типа энергия расходуется на работу внешнего насоса, обеспечивающего рециркуляцию жидкости и/или газа;
- в биореакторах III типа энергия расходуется на сжатие и подачу газа в культуральную жидкость.

Развитие промышленности антибиотиков продвинуло далеко вперед проблему создания специальной аппаратуры для культивирования микробов тАФ продуцентов БАВ (аминокислот, антибиотиков, полисахаридов, витаминов, ферментов и других соединений). Были предложены различного типа биореакторы для выращивания микроорганизмов, однако все конструкции ферментаторов (ферментеров) оставались в основном сходными по большинству параметров и, усредненно, их можно подразделить на 2 типа: без подводки стерильного воздуха (для анаэробов) и с подводкой его (для аэробов). Аэрируемые биореакторы могут быть с мешалками и без них.

В последние годы апробированы мембранные биореакторы, биореакторы с полыми волокнами и некоторые другие.

При расчете и конструировании биореакторов необходимо учитывать время протекания различных биологических процессов у представителей различных групп организмов.

Размеры ферментаторов определяются соотношением внешнего диаметра к высоте, который варьирует обычно в пределах от 1:2 до 1:6. Почти универсальными и чаще используемыми являются ферментаторы для анаэробных и аэробных процессов. Эти ферментаторы в свою очередь классифицируют по способу ввода в аппарат энергии для перемешивания газовой фазой (ФГ), жидкой фазой (ФЖ), газовой и жидкой фазами (ФЖГ) (табл. 9).

С использованием указанных классификаций удастся разработать единые методы инженерных расчетов основных конструктивных элементов и режимов работы ферментаторов.

Ферментаторы указанных трех групп имеют большое количество общих элементов. Различие же состоит в конструкциях аэрирующих и перемешивающих устройств. Примером конструктивного оформления ферментатора группы ФГ может быть аппарат с эрлифтом вместимостью 63 м³. В аппарате отсутствует механическое перемешивание, поэтому проще поддерживать асептические условия. Воздух для аэрации среды подается по трубе, расположенной вертикально в ферментаторе. Аэратор, конструкция которого обеспечивает вихревое движение выходящего воздуха, расположен в нижней части диффузора и насыщает питательную среду воздухом.

Таблица 9 – Основные типы ферментаторов

| Ферментаторы | Характеристика конструкции аппарата | Тип аппарата |
|-------------------------------------|---|---|
| ФГ с подводом энергии газовой фазой | Простота конструктивного оформления и высокая надежность в связи с отсутствием движущихся узлов и деталей | Барботажный, барботажно-эрлифтный, колонный (колонный), форсуночный |

| | | |
|------------------------------------|---|---|
| ФЖ с подводом энергии жидкой фазой | Обычно энергия передается жидкой фазе мешалкой или насосом | Эжекционный с циркуляционным контуром, с мешалкой |
| ФЖГ (комбинированные) | Основным конструктивным элементом является перемешивающее устройство, обеспечивающее высокую интенсивность растворения кислорода и высокую степень диспергирования газа. В то же время энергия газовой фазой выводится обычным способом | Барботажный с механическим перемешиванием |

Газожидкостная смесь поднимается по диффузору и перемешивается через его верхние края. В этой же зоне часть воздуха уходит из аппарата, и более плотная среда опускается вниз в кольцевом пространстве между корпусом ферментатора и диффузором. Так происходит многократная циркуляция среды в ферментаторе. Для отвода биологического тепла внутри ферментатора установлен змеевик, а также аппарат снабжен секционной рубашкой. Недостатком этих аппаратов является низкая интенсивность массообмена по кислороду. Известны ферментаторы этого типа объемом 25, 49, 63 и 200 м³.

Эффективность работы ферментатора определяется прежде всего необходимой интенсивностью перемешивания. Перемешивающие устройства служат для сохранения равномерного температурного поля по всему объему аппарата, своевременного подвода продуктов питания к клеткам и отвода от них продуктов метаболизма, а также интенсификации массопередачи кислорода. Для создания в ферментаторе условий "полного отражения", во избежание образования вращательного контура, который резко снижает интенсивность перемешивания, в аппарате устанавливают отражательные перегородки (отбойники). Важным элементом в конструкции ферментатора являются теплообменные устройства. Применение высокопродуктивных штаммов биобъектов, концентрированных питательных сред, высокий удельный

расход мощности на перемешивание тАФ все эти факторы сказываются на существенном возрастании тепловыделений, и для отвода тепла в ферментаторе устанавливают наружные и внутренние теплообменные устройства.

Контрольные вопросы:

1. Укажите основные типы ферментаторов.
2. Какие приемы аэрации среды вам известны?

Лабораторная работа № 13

Контроль сырья для микробиологических процессов. Работа с диагностическими сыворотками и бактериофагами

Цель занятия: ознакомиться с принципами контроля качества сырья, качества питательных сред.

Порядок выполнения лабораторной работы:

1. Законспектируйте основные понятия.
2. Заполните таблицу 10.
3. Ответьте на контрольные вопросы.

Одним из важных этапов микробного биосинтеза является приготовление питательных сред. Отделение приготовления питательной среды на современном биотехнологическом производстве - это цех, оборудованный емкостями для хранения твердых и жидких веществ, средствами их транспортировки и аппаратами с перемешивающими устройствами для приготовления растворов, суспензий или эмульсий.

Условно реактивы для приготовления питательных сред подразделяются по чистоте на несколько групп.

В порядке увеличения чистоты их можно распределить в следующий ряд:

1. "технический" с коричневой полосой на этикетке;
2. "чистый" или "ч" с зеленой полосой;
3. "чистый для анализа" или "чда" с синей полосой;
4. "химически чистый" или "хч" с красной полосой;
5. "особо чистый" или "осч" с желтой полосой.

Для импортных реактивов существуют похожие градации.

Для приготовления производственной питательной среды предварительно растворяют сахара и соли, тщательно суспендируют такие нерастворимые компоненты, как соевая мука и мел. Крахмалосодержащее сырье предварительно клейстеризуют. Для ускорения эти

процессы проводят в небольших аппаратах с мешалками (реакторах), а затем растворы смешивают в смесителе-реакторе с плоским дном, снабженным барботажным устройством для ввода пара. Концентрат среды, составляющий около одной трети крайне важного объема, для окончательного растворения и суспендирования нагревают острым паром до 70-80 °С. При этой температуре не происходит разложения термолabileльных компонентов среды. Приготовление более концентрированных сред дает возможность использования смесителей меньшей вместимости.

Питательная среда перед подачей в ферментер должна быть обеззаражена. На этом этапе подготовки субстрата крайне важно решить две задачи: полностью уничтожить всю контаминантную микрофлору, которая содержится в крайне важном для культивирования объеме жидкости, и сохранить биологическую полноценность питательной среды.

Для приготовления питательных сред и растворов, используемых при микробиологическом анализе, допускается применение химических веществ по степени чистоты не ниже ЧДА (чистая для анализа).

Основным фактором, определяющим качество и дальнейшую пригодность питательной среды, является правильность ее приготовления. Приготовление сред должно осуществляться со строгим соблюдением рецептуры приготовления и условий стерилизации, определенных изготовителем.

Контроль питательных сред на этапе приготовления включает:

- оценку внешнего вида готовой среды;
- измерение рН питательной среды до и после автоклавирования;
- определение стерильности (отсутствия контаминации) готовой среды;
- постановку качественного контроля биологических свойств среды.

Оценку внешнего вида готовой питательной среды проводят визуально. Цвет, прозрачность и консистенция приготовленной среды должны быть типичны для данной питательной среды и соответствовать нормативной документации изготовителя.

На некоторые наиболее часто встречающиеся ошибки при приготовлении сред указывают:

- потемнение среды вследствие перегревания или недостаточного перемешивания;
- неполное растворение (комки) порошкообразной среды;

- образование осадка.

Значение водородного показателя определяют с помощью рН-метров для агаризованных и жидких питательных сред. Определение проводят согласно инструкции по использованию приборов.

Отклонение рН среды за пределы диапазона, указанного в паспорте, приводит к ухудшению ее биологических свойств, вплоть до полной непригодности. Отклонения водородного показателя или другие проблемы с рН могут быть вызваны:

- перегревом, в том числе при стерилизации;
- недостаточным перемешиванием (менее 15 минут);
- использованием щелочного стекла;
- загрязнением емкостей, в которых готовилась среда;
- дистиллированной водой низкого качества.

Определение стерильности (для стерилизуемых сред) и отсутствия контаминации (для нестерилизуемых сред) проводят путем выдержки в течение 48 - 72 часов при температуре 35 - 37 °С.

Огромное значение имеет питательная среда при культивировании клеток эукариот *in vitro*. Она должна содержать сбалансированный состав макро- и микроэлементов, углеводов, витаминов, регуляторов роста, аминокислот. Для успешного размножения *in vitro* в большинстве случаев прописи сред приходится подбирать индивидуально для каждого вида и даже сорта или культивара различных растений.

Ткани, выращиваемые в жидких питательных средах, обычно культивируют в роллерах с круговым перемешиванием среды или в шейкерах вибрирующего типа, иногда используют стационарную среду, помещая ткань на мостики из фильтровальной бумаги.

Химический состав среды, ее физические свойства должны соответствовать задачам, поставленным на данном этапе исследования. Основные задачи, которые решает исследователь при размножении растений в асептических условиях, можно сформулировать так: ввести в культуру, размножить (этап мультипликации), укоренить, высадить *ex situ* с последующей постасептической адаптацией. В соответствии с задачами процесс клонального размножения принято условно разделять на соответствующие этапы.

1. На первом этапе часто в состав сред вводят **антиоксиданты**, предупреждающие активацию гидролитических ферментов и гибель высаженных эксплантов.

2. На втором этапе состав среды преимущественно такой же, однако во многих случаях ее обогащают веществами, которые

вызывают и многократно усиливают формообразовательные процессы, применяя увеличенные концентрации цитокининов.

3. На третьем этапе подбирается состав среды, способствующий укоренению регенерантов; она или вообще не содержит фитогормонов, или содержит лишь небольшие количества ауксинов.

Успех клонального размножения во многом зависит от наличия и концентрации в среде тех или иных элементов минерального питания, органических соединений. Необходимо четко представлять, из какой климатической зоны происходит растение, знать его биологию и особенности размножения. Сегодня широко известен целый ряд готовых базовых питательных сред для всех этапов микроразмножения растений, однако предпочтительнее индивидуальное покомпонентное приготовление каждого типа питательной среды. Во-первых, это намного дешевле, во-вторых, позволяет своевременно и оперативно реагировать на изменения в поведении культуры *in vitro*.

Растворы **регуляторов роста и витаминов** обычно готовят из расчета 1 мг вещества на 1 мл раствора. Цитокинины (6-бензиламинопурин (БАП), зеатин, кинетин) сначала растворяют в не большом количестве 1 н щелочи, ауксины (ИУК, 1-нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксипуксусная кислота (2,4-Д)) – в 1 капле этанола и затем доводят до нужного объема бидистиллированной водой. Растворы витаминов и фитогормонов также хранят в холодильнике, однако для лучшей сохранности их можно разливать в емкости (эпендорфы) по 3-5 мл (для разового использования) и хранить в морозильной камере. Кинетин плохо растворим. С этой целью можно использовать различные растворители: 1 М раствор HCl (несколько капель), 50%-й раствор этанола, диметилсульфат или 2%-й раствор NaOH. Гиббереллины растворяют в теплой дистиллированной воде. При этом следует помнить, что эти соединения термонестабильны. Гумат натрия, гидролизат казеина, дрожжевой автолизат готовят в день их использования. Агар лучше расплавить непосредственно перед употреблением в половинном объеме бидистиллированной воды, а затем добавлять к среде. Все манипуляции по приготовлению растворов удобно проводить с помощью магнитной мешалки. Дистиллированная вода должна быть теплой (37-40°C). Наиболее часто используются среды с показателем pH от 4,3 до 6,0, т. е. в кислом диапазоне. Иногда, при длительном культивировании некоторых видов, со временем может произойти закисление культуральной среды, что негативно влияет на темпы роста. В этом случае необходимо проверить кислотность

отработанной среды, и если сдвиг действительно произошел, то нужно чаще проводить пассажи.

Таблица 10 – Значение компонентов среды

| Компоненты среды | Примеры веществ | | | | Назначение |
|----------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------|------------|
| | Для культур прокариот | Для грибных культур | Для культуры клеток растений | Для культуры клеток животных | |
| Питательные вещества | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Антиоксиданты | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Регуляторы роста | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Контрольные вопросы

1. Органолептический контроль сырья для приготовления питательных сред.
2. Методы контроля качества питательной среды.
3. Классификация химических реактивов и сырья по степени чистоты.

Словарь терминов (гlossарий)

Автоселекция – процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм микроорганизмов более приспособленными.

Анатоксин – это бактериальный экзотоксин, потерявший токсичность в результате длительного воздействия формалина, но сохранивший антигенные свойства.

Библиотека генома – набор клонированных фрагментов ДНК, содержащий весь геном.

Аэротенк – смеситель-резервуар для очистки сточных вод.

Барда – отход производства спирта.

Биобезопасность – состояние защищенности человека, общества, цивилизации и окружающей среды от вредного, опасного для жизни и здоровья человека воздействия токсических и аллергенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах.

Биогенез – образование органических соединений живыми организмами.

Биомасса – общая масса особей одного вида, группы видов или сообщества в целом на единицу поверхности или объема местообитания.

Биологический агент (штамм - продуцент целевого продукта) – активное начало и основа любого биотехнологического производства, физиолого-биохимические характеристики и свойства которого определяют в конечном итоге эффективность всего биотехнологического процесса.

Биореактор – закрытая или открытая емкость, в которой при определенных условиях протекает на клеточном уровне контролируемая реакция, осуществляемая с помощью микроорганизмов.

Вакцины – это препараты, приготовленные из убитых или ослабленных болезнетворных микроорганизмов или их токсинов.

Вектор – самореплицирующаяся (автономная) молекула ДНК, используемая в генной инженерии для переноса генов и других последовательностей от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.

Вектор – молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечить там ее размножение.

Генная инженерия – совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезокси-рибонуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с ними и введению их в другие организмы.

Генетический код (ГК) – система записи наследственной информации в виде последовательности нуклеотидов в молекулах нуклеиновых кислот. Единицей ГК служит кодон, или триплет (тринуклеотид). ГК определяет порядок включения аминокислот в синтезирующуюся полипептидную цепь.

Генетический риск – возможность проявления непредсказуемых, опасных для здоровья и жизни человека и для окружающей среды наследственных изменений генома и качества организма.

Генно-инженерная деятельность – деятельность ученых, специалистов, научных организаций и государственных органов, направленная на получение, испытание, транспортировку и использование генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов.

Генотерапия – лечение наследственных болезней с помощью введенных в геном реципиента чужеродных генов или вживление полноценных генетических соматических клеток в ткани биологического объекта.

Геном – совокупность генов, содержащихся в гаплоидном (одинарном) наборе хромосом и в нехромосомных генах, расположенных в органеллах протоплазмы данного организма. Диплоидные организмы содержат два генома — отцовский и материнский.

ДНК-лигаза – фермент «сшивающий» участки молекулы ДНК.

Иммобилизация – перевод ферментов в нерастворимое состояние.

Иммуногенность – свойство антигена вызывать иммунный ответ.

Интерфероны – группа белковых веществ, вырабатываемых зараженными вирусами.

Клонирование – размножение в бактериальной клетке рекомбинантной молекулы ДНК.

Кодон – триплет нуклеотидов, кодирующий определенную аминокислоту или комплементарный терминирующий сигнал.

Компетенция – способность клетки, ткани, органа, организма воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.

Космиды – плазмидные вектора, в которые встроен участок генома фага λ , обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу. Фаговые частицы обеспечивают хорошее проникновение гибридной ДНК в клетку (путем инъекции), после чего происходит замыкание ДНК в кольцо по липким концам и репликация ее по плазмидному типу.

Криоконсервация – глубокое замораживание клеток.

Культуральная жидкость – сложная смесь, состоящая из клеток штамма-продуцента, раствора непотребленных питательных компонентов и накопившихся в среде продуктов биосинтеза.

Лаг-фаза – медленный рост культуры в период адаптации.

Лигаза – фермент, «сшивающий» связи между геном и плазмидой с образованием ковалентных фосфо-эфирных связей.

Лигирование – образование фосфодиэфирной связи между двумя основаниями одной цепи ДНК, разделенными разрывом. Этот термин употребляют также в случае соединения тупых концов и при образовании связи в РНК.

Липкий конец – свободный одноцепочечный конец двухцепочечной ДНК, комплементарной одноцепочечному концу, принадлежащему этой же или другой молекуле ДНК.

Лиофильное высушивание – обезвоживание после замораживания.

Лузга – отход при производстве масла из семян подсолнечника.

Маркер (ДНК) – фрагмент ДНК известного размера, используемый для калибровки фрагментов в электрофоретическом геле.

Маркерный ген – ген, идентифицированный по месту расположения и имеющий четкое фенотипическое проявление.

Мезга – отход производства крахмала, соков и т.д.

Меласса – отход производства сахара.

Модификация продукта – перестройка полученных соединений животного, растительного или микробного происхождения с целью придания им специфических свойств.

Папаин – фермент, получаемый из продуктов папайи.

Плазида – добавочные кольца молекулы ДНК бактерий.

Плазида – основа плазмидного вектора — кольцевая двухцепочечная ДНК, обладающая способностью к автономной репликации, а также к встраиванию в нее и передачи в геном реципиента чужеродных генов и других последовательностей ДНК.

Промотор – участок гена, ответственный за начало его транскрипции.

Пролиферация – новообразование клеток и тканей путем размножения.

Рекомбинантные биообъекты – биообъекты, в которые путем генно-инженерных манипуляций введена чужеродная ДНК, ответственная за синтез чужеродного или гетерологического продукта.

Рекомбинантный ген – ген, состоящий из компонентов различных генов.

Рекомбинантная ДНК – ДНК, состоящая из участков различных исходных молекул ДНК.

Рекомбинация – перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинативной изменчивости.

Рестриктаза – фермент, разрезающий молекулу ДНК.

Рестриктаза – это эндонуклеаза, узнающая какую-то последовательность внутри цепи ДНК (сайт рестрикции, см. выше) и проводящая гидролиз (разрыв) этой цепи.

Реципиент – клетка, в которую переносят чужеродный ген.

Сайт рестрикции – небольшой участок ДНК для узнавания ферментом – рестриктазой.

Скрининг – проверка полученных клонов.

Соматическая гибридизация – процесс вовлечения в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например, путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений.

Трансляция – синтез белка в рибосомах при участии информационной, транспортной РНК и других факторов.

Тотипотентность – полноценность, информативность.

Транскрипция – образование РНК-копии на матрице ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы.

Трансформация – процесс внедрения плазмиды-вектора внутрь клетки с внесением чужеродной ДНК.

Ультрафильтрация – отделение веществ с помощью мембранных фильтров.

Фагмиды – векторы содержащие элементы вирусной нуклеиновой кислоты и плазмиды, что дает им возможность в определенных условиях образовывать зрелые фаговые частицы или существовать в бактериальных клетках в виде плазмид.

Фазмиды – гибриды между фагом и плазмидой. После встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, в других – как плазмиды.

Ферменты – катализаторы белковой природы.

Шелуха – твердая оболочка семян.

Экспрессия гена — проявление (самовыражение) функционирования генетической информации, записанной в гене, в форме рибонуклеиновой кислоты, белка и фенотипического признака.

Электропорация – метод переноса генов в клетки с помощью электрического разряда, вызывающего образование дополнительных пор в клеточной мембране.

Экзотоксины – это белковые вещества, выделяемые клетками бактерий во внешнюю среду.

Рекомендуемая литература

1. Ермаков В.В.. Биотехнология : практикум [Электронный ресурс] / Датченко О.О., Титов Н.С., Ермаков В.В. — Кинель : РИО СамГАУ, 2020 .— 178 с. — ISBN 978-5-88575-613-6 .— Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/735795>
2. Вирусология и биотехнология : учебник / Р. В. Белоусова, Е. И. Ярыгина, И. В. Третьякова [и др.]. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 220 с. — ISBN 978-5-8114-2266-1. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/169102>
3. Биотехнология в животноводстве : учебное пособие / составитель Т. Ю. Гусева. — пос. Караваяево : КГСХА, 2018. — 140 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133505>
4. Биотехнология в животноводстве: методические указания / За-спа Л.Ф.; Ухтверов А.М. — Кинель : РИО СГСХА, 2019 .— 27 с. — URL: <https://rucont.ru/efd/684378>
5. Бабайлова, Г. П. Технология производства продукции животно-водства с основами биотехнологии : учебное пособие для вузов / Г. П. Бабайлова, Е. С. Симбирских, Ю. С. Овсянников. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 240 с. — ISBN 978-5-8114-8738-7. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/200267>

Дмитрий Юрьевич Ильин
Галина Викторовна Ильина

Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции

Учебное пособие

Компьютерная верстка Г.В. Ильиной

Подписано в печать

Формат 60 × 84 1/16

Бумага Гознак Print

Отпечатано на ризографе

Усл. печ. л. 5,25

Тираж 100 экз.

Заказ №

РИО ПГАУ
440014, г. Пенза, ул. Ботаническая, 30