

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Ю. Г. Максимова, А. Ю. Максимов

БИОРЕСУРСЫ И BIOTEХНОЛОГИИ

ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ

*Допущено методическим советом
Пермского государственного национального
исследовательского университета в качестве учебного пособия
для студентов, обучающихся по направлению
подготовки бакалавров «Биология»*



Пермь 2019

УДК 663.15(075.8)

ББК 30.16я7

М171

Максимова Ю. Г., Максимов А. Ю.

М171 Биоресурсы и биотехнологии. Основы биотехнологии: учеб. пособие / Ю. Г. Максимова, А. Ю. Максимов; Перм. гос. нац. исслед. ун-т. – Пермь, 2019. – 104 с.: ил.

ISBN 978-5-7944-3298-5

Рассмотрены основы биотехнологии, касающиеся культивирования микроорганизмов и ферментации, управления отходами, генетической инженерии, мониторинга состояния окружающей среды с помощью биоиндикации и биотестирования. Приведен обзор современных биологических методов, включающих «омикс»-технологии и микроскопию, которые находят свое применение в биотехнологических исследованиях.

Учебное пособие предназначено для студентов биологического факультета, изучающих курс «Биоресурсы и биотехнологии».

Ил. 31. Библиогр. 29 назв.

УДК 663.15(075.8)

ББК 30.16я7

Печатается по решению ученого совета биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета

Рецензенты: лаборатория молекулярной микробиологии и биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (рецензент – зав. лабораторией д.м.н. профессор, чл.-корр. РАН **В. А. Демаков**); зав. кафедрой химической биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета, д.т.н. **Н. Б. Ходяшев**

ISBN 978-5-7944-3298-5

© ПГНИУ, 2019

© Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю.,
2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1	
ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ	7
1.1. История развития биотехнологии	7
1.2. Разделы биотехнологии.....	10
1.3. Элементы, слагающие биотехнологические процессы...	12
Глава 2	
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И ПРОЦЕССЫ ФЕРМЕНТАЦИИ	15
2.1. Основные характеристики процесса ферментации.....	16
2.2. Культивирование микроорганизмов.....	17
2.2.1. Периодическое культивирование.....	18
2.2.2. Непрерывное культивирование.....	21
2.2.3. Твердофазное культивирование.....	26
2.3. Масштабирование процессов ферментации.....	28
2.4. Хранение микроорганизмов.....	30
Глава 3	
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЧИСТКЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	33
3.1. Очистка сточных вод.....	33
3.1.1. Очистка сточных вод от соединений азота.....	38
3.1.2. Очистка сточных вод от соединений фосфора.....	45
3.1.3. Очистка сточных вод от соединений серы.....	47
3.1.4. Основные проблемы биологической очистки..... сточных вод и пути их решения.....	49
3.2. Очистка загрязненных почв.....	51
3.3. Утилизация твердых бытовых отходов.....	55
Глава 4	
ГЕННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ	63
4.1. Основные принципы генетической инженерии.....	63
4.1.1. Ферменты, используемые в генетической инженерии...	65
4.1.2. Способы получения рекомбинантной ДНК.....	70

4.1.3. Клонирование и отбор клонов.....	72
4.1.4. Технологии редактирования геномов высших организмов: CRISPR/Cas 9 и TALEN.....	76
4.2. Клеточная инженерия.....	82
Глава 5	
БИОИНДИКАЦИЯ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ.....	85
5.1. Использование прокариотов в биоиндикации и биомониторинге.....	88
Глава 6	
СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ	
В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ.....	92
6.1. Метагеномика.....	92
6.2. Протеомика.....	94
6.3. Метаболомика.....	95
6.4. Электронная, конфокальная лазерная и атомно-силовая микроскопия.....	96
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

Введение

Термин «биотехнология» состоит из нескольких слов: **био-** (от др.-греч. βίος – жизнь) означает отношение к жизни; **техно-** (от др.-греч. τέχνη – искусство, мастерство, умение) и **логос-** (от греч. λόγος – слово, мысль, смысл, понятие), которые составляют понятие «**технология**» – совокупность методов и инструментов для достижения желаемого результата. В широком смысле «технология» означает применение научного знания для решения практических задач. Однако до сих пор нет единого определения биотехнологии. Исторически сложилось, что биотехнология означает деятельность микроорганизмов, которую использует и направляет человек для получения каких-либо продуктов. Наиболее общим является следующее определение: **биотехнология** – это управляемое, целенаправленное получение полезных продуктов для различных сфер человеческой деятельности, базирующееся на использовании каталитического потенциала (биохимической деятельности) различных биологических агентов и систем – микроорганизмов, вирусов, растительных и животных клеток и тканей, а также внеклеточных веществ и компонентов клеток. Это определение не включает понятие генетической инженерии, которую можно рассматривать не как раздел биотехнологии, а как методологию или самостоятельную дисциплину.

Биотехнология – это междисциплинарная наука, включающая в себя знания, получаемые в различных науках. В основе биотехнологии лежит микробиология, биохимия, генетика, химическая, механическая технология и биоинженерия, технология пищевой промышленности и электроника.

Важнейшими задачами, стоящими перед современной биотехнологией, являются:

- создание новых сортов растений и пород животных и повышение их продуктивности;
- защита окружающей среды и утилизация отходов;
- создание новых экологически чистых процессов получения энергии;
- создание новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины;

- производство ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов) для применения в животноводстве;
- создание новых технологий получения ценных продуктов для использования в пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности.

Далеко не всегда биотехнологические процессы могут заменить традиционные химические процессы. Для такой замены необходимо, чтобы биотехнологические процессы были более экономичными, экологичными или совсем не иметь альтернативы. Поэтому при выборе метода получения конкретного целевого продукта должна производиться технико-экономическая оценка получения подобных продуктов альтернативными традиционными методами. Биотехнологические процессы часто бывают экологически безопасными, но при этом могут уступать в эффективности более быстрым химическим процессам.

Принципиальное отличие биотехнологических процессов от химических заключается в следующем:

- биологические агенты чувствительны к физико-механическим воздействиям;
- существует межфазный перенос веществ (по типу «жидкость – клетки», «газ – жидкость – клетки»);
- требуется соблюдение условий асептики;
- скорости протекания многих процессов невысокие;
- получение целевых продуктов нестабильно;
- культивирование в ферментерах сопровождается пенообразованием;
- сложна регуляция роста микроорганизмов и биосинтеза необходимых веществ в производственных масштабах.

Развитие биотехнологий в современных условиях необходимо и перспективно, особенно в таких областях, как получение фармакологических препаратов и диагностических средств, при разработке биосенсоров, для создания высокопродуктивных, устойчивых к болезням и вредителям культурных растений и сельскохозяйственных животных, при получении эффективных биопестицидов и биогербицидов, в процессах биокатализа, биосинтеза и биодеградации, а также для получения энергии.

Глава 1. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

1.1. История развития биотехнологии

Предысторию формирования биотехнологии можно подразделить на ряд этапов:

- появление эмпирической технологии в 6-м тысячелетии до н.э.,
- зарождение естественных наук в XV–XVII вв.;
- формирование микробиологических производств и начало взаимодействия науки с микробиологическими производствами в конце XIX – начале XX в., вызвавшее их революционное преобразование;
- создание научно-технических предпосылок для возникновения современной биотехнологии (10-е – конец 40-х гг. XX в.).

Первый микробиологический процесс, использованный на практике – **брожение**. Брожение представляет собой анаэробный метаболический распад молекул питательных веществ, который происходит под воздействием микробных ферментов. Возбудителями бродильных процессов являются грибы, бактерии, дрожжи.

В **XIX в.** с развитием химических наук были заложены основы органической химии. В 1872 г. русский врач и биохимик **В.А. Манассеин** (1841-1901) установил, что спиртовое брожение может проходить в отсутствие живых клеток. Окончательно вопрос о возможности осуществления брожения без живых клеток микроорганизмов был решен в конце XIX в. В 1897 г. братья **Г. и Э. Бухнеры** показали, что экстракт растертых дрожжей способен вызывать спиртовое брожение. Они предполагали, что этот процесс вызывается одним ферментом. Русский ученый **А.Н. Лебедев** усовершенствовал способ получения из дрожжей экстракта, содержащего ферменты, и показал, что процесс брожения многоэтапный и осуществляется различными ферментами. Так было установлено, что причиной брожения могут быть как сами живые клетки, так и ферменты, образуемые клеткой.

Огромное влияние на создание научных основ микробиологических производств имели работы **Луи Пастера**, кото-

рый по просьбе правительства Франции исследовал причины нарушения технологических процессов в ряде производств. В 1857 г. Л. Пастер при изучении спиртового брожения установил, что оно является результатом жизнедеятельности дрожжей без доступа кислорода. Л. Пастер исследовал также молочно-кислое и масляно-кислое брожение. Он ввел термины «аэробный» и «анаэробный» для обозначения жизни в присутствии или в отсутствие молекулярного кислорода. Также Л. Пастер изучил этиологию многих инфекционных заболеваний и разработал метод профилактической вакцинации против куриной холеры (1879 г.), сибирской язвы (1881 г.), бешенства (1885 г.), ввел методы асептики и антисептики. Пастер неоспоримо доказал, что самозарождение жизни в настоящих условиях невозможно, а болезни, порча продуктов, брожение и гниение вызываются микроорганизмами.

В 70–80-е гг. XIX в. были заложены основы культивирования растительных клеток и животных тканей. **Роберт Кох** (1843–1910) разработал **метод чистых культур** для изучения микроорганизмов и усовершенствовал среды для их выделения и выращивания. Чистые культуры стали применять в сложившихся микробиологических производствах.

Немецкие исследователи **Г. Гельригель** и **Г. Вильфарт** установили микробную природу процесса фиксации азота бобовыми растениями, а **Мартин Бейеринк** (1851–1931) выделил чистую культуру клубеньковых бактерий и доказал их присутствие в ризосфере растений.

Развитие биотехнологии в 10-40-е гг. XX в. можно условно подразделить на 2 этапа. На протяжении 1-го этапа происходило усовершенствование технологии существующих и организация новых производств. В этот период начался выпуск новых экологически чистых биоудобрений и биологических препаратов для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений, возникли микробиологические производства ряда целевых продуктов (органических кислот, спиртов), начались промышленные испытания биотехнологических процессов переработки и использования растительных отходов. На 2-м этапе биотехнологическими методами начали получать ряд сложных веществ – антибиотиков, ферментов, витаминов.

Технология производства антибиотиков была реализована в промышленности.

Академик АН СССР **В.Н. Шапошников** (1884–1968) – российский микробиолог, один из основоположников технической микробиологии в СССР, заложил основы промышленного производства молочной и масляной кислот, ацетона, бутилового спирта. Он развил учение о двухфазном характере брожения. На основе исследований В. Н. Шапошникова и его сотрудников в 20-х гг. было разработано микробиологическое производство молочной и масляной кислот, а в 30-х г. – ацетона и бутилового спирта. В 1923 г. было организовано первое микробиологическое промышленное производство лимонной кислоты. На этом этапе микробиологические производства оказались более рентабельными и вытеснили химические процессы получения этих веществ. Вплоть до 1940 г. производство ряда органических кислот, ацетона, бутанола, пропанола, этилового спирта, глицерина осуществлялось в основном микробиологическими способами. Также в 30-е гг. в СССР было организовано производство технических препаратов некоторых ферментов и витаминов, синтезируемых микроорганизмами.

Революционным открытием явилось обнаружение **А. Флемингом** химиотерапевтического действия пенициллина. Работу Флеминга продолжили **Г. Флори** и **Э.Б. Чейн**, разработавшие методы очистки этого антибактериального вещества. В СССР **З.В. Ермольева** с сотрудниками получили свой препарат пенициллина, а **Г.Ф. Гаузе** и **М.Г. Бражникова** – антибиотик грамицидин.

После Второй мировой войны в ходе интенсивного развития промышленных биотехнологий были организованы производства аминокислот, белка одноклеточных, превращение стероидов, освоено культивирование клеток животных и растений.

На развитие биотехнологий большое влияние оказал прогресс в молекулярной биологии. В 1952 г. **Д. Уотсон** и **Ф. Крик** стали работать над моделированием структуры ДНК. Используя правила **Э. Чаргаффа** и рентгенограммы **Р. Франклин** и **М. Уилкинса**, они построили двухспиральную модель ДНК.

Результаты работы были опубликованы 30 мая 1953 г. в журнале Nature, а в 1962 г. Д. Уотсон, Ф. Крик и М. Уилкинс получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие структуры ДНК.

Возникновение **генетической инженерии** условно относят к 1972 г., когда в США **П. Бергом** была создана первая рекомбинантная молекула ДНК. Генетическая инженерия – направление исследований в молекулярной биологии и генетике, конечной целью которых является получение с помощью лабораторных приемов организмов с новыми комбинациями наследственных свойств.

Эра новейших биотехнологических процессов, возникшая в течение последних 25–30 лет, связана с использованием иммобилизованных ферментов, клеточных органелл и целых клеток. Активно развивается такое направление биотехнологии, как **биокатализ** (ферментативный катализ) – ускорение химических реакций каталитически активными белками (ферментами).

1.2. Разделы биотехнологии

В современной биотехнологии целесообразно выделить в качестве самостоятельных разделов следующие:

- промышленную микробиологию;
- медицинскую биотехнологию;
- технологическую биоэнергетику;
- сельскохозяйственную биотехнологию;
- биогидрометаллургию;
- инженерную энзимологию;
- клеточную и генетическую инженерию;
- экологическую биотехнологию.

Экологическая биотехнология – это научно-техническое направление, включающее применение биотехнологии для решения проблем окружающей среды (обработка сточных вод, переработка твердых отходов, борьба с загрязнениями окружающей среды). Одна из важнейших задач биотехнологии заключается в ограничении масштабов загрязнения

нашей планеты промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми отходами. Экологическая биотехнология включает: 1) аэробные и анаэробные процессы очистки сточных вод; 2) производство энергии; 3) переработку твердых бытовых отходов; 4) биodeградацию ксенобиотиков в окружающей среде; 5) извлечение металлов; 6) биотехнологические подходы в животноводстве; 7) биотехнологические подходы в сельском хозяйстве.

Задачами экологической биотехнологии являются:

1. Микробиологическая трансформация отдельных классов органических ксенобиотиков: нефти и нефтепродуктов; поверхностно-активных веществ; галогенсодержащих органических соединений; полициклических ароматических углеводородов; пестицидов.

2. Микробиологическая трансформация тяжелых металлов.

3. Биологическая очистка промышленных и природных загрязненных водных сред.

4. Биологическая очистка и дезодорация газовоздушных выбросов.

5. Микробиологическая переработка твердых отходов и создание биodeградируемого сырья.

6. Биоремедиация почв, в том числе фиторемедиация.

7. Компостирование и биodeградация отходов сельского хозяйства; создание биоудобрений, стимуляторов роста и биологических средств защиты растений, пробиотиков для сельскохозяйственных животных.

8. Создание альтернативной энергетики, биотоплива.

Промышленная микробиология – наука о важнейших микробиологических процессах и их практическом применении для получения индустриальным способом метаболитов, белков и других ценных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, используемых в различных отраслях народного хозяйства и медицины, для получения биомассы, а также для проведения биокаталитических процессов.

Медицинская биотехнология. Этот раздел биотехнологии включает в себя разработку технологий получения новых антибиотиков, основанных на поиске микроорганизмов-

продуцентов и их селекции, разработку новых терапевтических средств и лекарственных препаратов на основе биокаталитических и биосинтетических технологий, получение вакцин, разработку диагностикумов, получение моноклональных антител, косметических токсинов, аминокислот медицинского применения, инсулина, иммуномодуляторов и иммунодепрессантов, витаминов, коферментов.

1.3. Элементы, слагающие биотехнологические процессы

Биотехнологические процессы слагаются из следующих элементов:

- биологического агента,
- субстрата,
- продукта,
- аппаратуры.

Основополагающим элементом биотехнологических процессов является биологический агент. Им могут быть: 1) микробные клетки, 2) ферменты, 3) вирусы, 4) растительные ткани, 5) животные ткани, 6) компоненты клеток (мембраны, протопласты, митохондрии).

Микробные клетки – традиционный объект биотехнологических процессов. При выборе биологического агента и внедрении его в производство необходимо соблюдать принцип технологичности штаммов:

- микробная клетка, популяция или сообщество особей должны сохранять свои основные физиолого-биохимические свойства в процессе длительного ведения ферментации;
- промышленные продуценты также должны обладать устойчивостью к мутационным воздействиям, фагам, заражению посторонней микрофлорой (контаминации);
- быть безвредными для людей и окружающей среды, не выделять в процессе культивирования токсичные продукты обмена;
- иметь высокий выход требуемого продукта.

Кроме микроорганизмов, традиционно используемых в биотехнологической промышленности (дрожжей, генно-

инженерных штаммов *E. coli*), перспективно использование автотрофов, экстремофилов, смешанных культур и природных ассоциаций.

В качестве субстратов и сред в биотехнологическом процессе могут быть использованы: меласса (кормовая патока), сок сахарного тростника, гидролизаты растительных полимеров; сахара, спирты, органические кислоты; парафины нефти; полупродукты, предшественники биотрансформации; природный газ, водород; отходы сельскохозяйственной и лесной промышленности; отходы пищевой промышленности, в том числе переработки фруктов и овощей; бытовые отходы и сточные воды; молочная сыворотка; картофель, зерно; зеленая биомасса растений.

Продукты жизнедеятельности микроорганизмов занимают первое место по разнообразию и объемам производства среди других, получаемых в биотехнологических процессах. Эти продукты подразделяются на три основные группы:

- **биомасса**, которая является целевым продуктом (белок одноклеточных) или биологическим агентом других биотехнологических процессов, например, биометаногенеза или бактериального выщелачивания металлов;
- **первичные метаболиты** – низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микроорганизмов в качестве строительных блоков макромолекул, коферментов, например, аминокислоты, витамины, органические кислоты;
- **вторичные метаболиты** (идиолиты) – соединения, не требующиеся для роста микроорганизмов и не связанные с их ростом, например, антибиотики, алкалоиды, гормоны роста и токсины.

Основными продуктами биотехнологических процессов являются следующие препараты и вещества: биоудобрения и биоинсектициды; биомасса микроорганизмов; белок одноклеточных; диагностикумы, вакцины; моноклональные антитела; медикаменты; гормоны; органические кислоты; полисахариды; пищевые продукты; экстракты, гидролизаты; спирты; органические растворители; антибиотики; аминокислоты; ферменты, витамины; металлы, неметаллы; биогаз.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные этапы формирования биотехнологии как науки.
2. Какие научные разработки явились основополагающими для развития биотехнологии?
3. Какие разделы выделяют в современной биотехнологии?
4. Что такое экологическая биотехнология? Что входит в задачи экологической биотехнологии?
5. Что такое промышленная микробиология?
6. Какие процессы входят в сферу медицинской биотехнологии?
7. Из каких элементов слагаются биотехнологические процессы?
8. Что может являться биологическим агентом биотехнологического процесса?
9. В чем заключается принцип технологичности штаммов?
10. Какие субстраты и среды могут быть использованы в биотехнологических процессах? Какие продукты могут быть получены?
11. На какие основные группы подразделяются продукты, получаемые в биотехнологических процессах?

Глава 2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И ПРОЦЕССЫ ФЕРМЕНТАЦИИ

Типовая схема биотехнологических производств состоит из следующих основных стадий:

1. Подготовительные (приготовление и стерилизация сред, предварительная обработка сырья, подготовка посевного материала, приготовление биокатализатора).
2. Биотехнологические (ферментация, биотрансформация, биокатализ, метановое брожение, биокомпостирование, биодеградация).
3. Разделение жидкости и биомассы (отстаивание, фильтрация, сепарация, центрифугирование, коагуляция, флотация).
4. Выделение внеклеточных или внутриклеточных продуктов (экстракция, центрифугирование, адсорбция, осаждение, отгонка, ректификация).
5. Очистка продукта (экстракция, осаждение, адсорбция, хроматография, диализ, ультрафильтрация, кристаллизация, ректификация).
6. Концентрирование продукта (выпаривание, сушка, осаждение, кристаллизация, фильтрация).
7. Изготовление готовой формы продукта.

Выделяют следующие виды продуктов по их месту в типовой технологической схеме:

- газы со стадии ферментации (диоксид углерода, метан, водород);
- среда ферментации – культуральная жидкость вместе с микроорганизмами (кефир, йогурт) или твердый субстрат (сыр);
- концентрат культуральной жидкости – выпаренный или высушенный (кормовой лизин, кормовые антибиотики);
- жидкость после отделения биомассы от культуральной жидкости (может быть готовым продуктом, например, пиво, вино, квас);
- инактивированная биомасса (кормовые дрожжи после тепловой стерилизации);
- жизнеспособная биомасса микроорганизмов, то есть биопрепараты (пекарские дрожжи, бактериальные сред-

- ства защиты растений, биодеструкторы, силосные закваски);
- ослабленная биомасса микроорганизмов (живые вакцины);
 - внеклеточный биопродукт (этанол, антибиотики);
 - внутриклеточный продукт (антибиотики, витамины);
 - переработанная биомасса микроорганизмов (гидролизаты и ферментоллизаты);
 - очищенный от загрязнений поток жидкости или твердая среда (стоки после биологической обработки);
 - среда ферментации (полутвердая), увеличившая свой объем за счет выделения газов микроорганизмами (хлеб, сыр).

2.1. Основные характеристики процесса ферментации

Ферментация – это процесс, в котором происходит преобразование исходного сырья в продукт с использованием биохимической деятельности микроорганизмов или изолированных клеток.

Процессы ферментации можно классифицировать по целевому продукту:

- ферментация, в которой целевым продуктом является сама биомасса микроорганизмов, обозначается термином **культивирование** или **выращивание**;
- процессы, в которых целевым продуктом является не сама биомасса, а продукты метаболизма, называют **биосинтезом**;
- ферментация, задачей которой является утилизация определенных компонентов исходной среды, в зависимости от типа процессов, называется **метановое брожение** (процесс биодеструкции органических веществ с выделением свободного метана), **биокомпостирование** (частичная минерализация органических остатков и формирование гумусоподобных веществ при их переработке микроорганизмами), **биодegradация** (разрушение сложных веществ и материалов в результате деятельности живых организмов).

По основной фазе, в которой протекает процесс ферментации:

- поверхностная (твердофазная) ферментация (культивирование на агаровых средах, на зерне, производство сыра и колбас, биокомпостирование);
- глубинная (жидкофазная) ферментация (биомасса суспендирована в жидкой питательной среде);
- газофазная ферментация (процесс протекает на твердом носителе, частицы которого взвешены в потоке газа, насыщенном аэрозодем питательной среды).

По отношению к кислороду:

- аэробная;
- анаэробная;
- факультативно-анаэробная.

По отношению к свету:

- световая;
- темновая.

По степени защищенности от чужеродной микрофлоры:

- асептическая;
- условно-асептическая;
- неасептическая.

По способу организации:

- периодическая;
- непрерывная;
- многоциклическая;
- отъемно-доливная;
- периодическая с подпиткой субстрата;
- полунепрерывная с подпиткой субстрата.

2.2. Культивирование микроорганизмов

Процессы культивирования микроорганизмов подразделяются на два основных типа:

- периодические;
- непрерывно-проточные.

Периодическая культура – это культура, растущая в замкнутом пространстве без дополнительного внесения субстратов роста и удаления продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. По мере использования пищевых ресурсов и накопле-

ния продуктов метаболизма исходная питательная среда становится культуральной средой.

Непрерывная, или проточная культура – это открытая система, в которую порциями или потоком поступает свежая питательная среда, при этом излишки культуры удаляют из культиватора.

Кроме того, известны и другие методы выращивания микроорганизмов, являющиеся модификациями двух основных типов культивирования.

Отъемно-доливной метод. Среда подается в проточный ферментер порциями. Отъем культуры также производится порциями или происходит постоянный слив. Кривая концентрации клеток при данном способе приобретает вид гребенки.

Многokrатное выращивание без стерилизации. Применяется в практике наращивания патогенных бактерий для получения вакцин или других биопрепаратов. Из ферментера после окончания цикла роста сливается не вся культура, а оставляется небольшая её часть. К ней добавляется стерильная среда, и цикл наращивания биомассы повторяется.

Продленная периодическая культура или метод подпитки. К периодической культуре добавляют свежую питательную среду по мере её истощения. Культура продолжает свой быстрый рост, который идет с постоянной скоростью до полного исчерпания всех компонентов питания.

Диализное культивирование. Культивирование ведут в гильзе, непроницаемой для клеток, но пропускающей растворенные вещества. Гильза с культурой помещается в проточную питательную среду. Из среды поступают компоненты питания, и в неё же выносятся продукты метаболизма. Таким путем получают сильно концентрируемую биомассу.

2.2.1. Периодическое культивирование

При периодическом культивировании выделяют следующие фазы роста: лаг-фаза, экспоненциальная, стационарная и фаза отмирания (рис. 1).

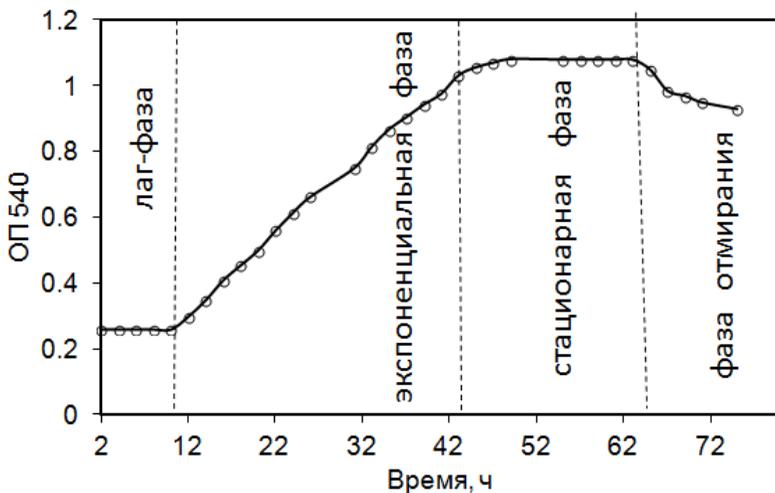


Рис. 1. Фазы роста периодической культуры микроорганизмов

В **лаг-фазе** целесообразно выделить две стадии:

- а) стадию покоя – время от момента посева микроорганизмов до начала их роста. В этот период число клеток не увеличивается, а в некоторых случаях – даже уменьшается;
- б) стадию задержки размножения. Клетки в течение этой стадии интенсивно растут, но слабо размножаются.

Количественные изменения состава бактериальной клетки во время лаг-фазы сильнее всего затрагивают РНК, содержание которой повышается в 8–12 раз.

Экспоненциальная фаза, или фаза логарифмического роста, характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток, при этом количество бактерий увеличивается в геометрической прогрессии. Время между двумя последовательными делениями бактерий в этой стадии постоянно для данного вида. За стадией сбалансированного роста уже в лог-фазе наступает стадия отрицательного ускорения, при которой скорость размножения бактерий перестает быть максимальной. В результате число делящихся особей уменьшается, а число погибших – увеличивается.

В стационарной фазе число поделившихся живых бактерий практически равно числу отмерших клеток, в результате чего наступает равновесие. Переход от лог-фазы к стационарной происходит постепенно.

В фазе отмирания можно выделить три стадии:

1) стадия ускорения гибели, характеризующаяся превышением числа отмирающих клеток над количеством вновь образующихся;

2) стадия логарифмической гибели – отмирание клеток происходит с постоянной скоростью;

3) стадия уменьшения скорости отмирания, во время которой оставшиеся в живых клетки переходят в стадию покоя.

Для того чтобы охарактеризовать кинетику роста периодической культуры и параметры роста микроорганизмов, вводят следующие показатели: удельную скорость роста, урожай биомассы, экономический коэффициент потребления субстрата.

Удельная скорость роста определяется по формуле

$$\mu = (dX/dt) \cdot 1/X_0, \text{ (ч}^{-1}\text{)}, \quad (1)$$

где μ – прирост биомассы в единицу времени на единицу биомассы,

X_0 – начальная биомасса,

t – время опыта.

Экспоненциальный рост популяции описывается уравнением

$$X = X_0 \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}, \quad (2)$$

где X и X_0 – биомасса в конце и в начале опыта соответственно;

t – время опыта;

e – основание натурального логарифма;

μ_{\max} – максимальная удельная скорость роста.

Урожай биомассы – это максимальное количество биомассы, которое может быть получено при заданных условиях в единице объема.

$$X = X_{\max} - X_0 \text{ (г/л; мг/мл)} \quad (3)$$

Экономический коэффициент потребления субстрата

$$Y = X/S, \quad (4)$$

где X – количество образовавшейся биомассы (масса сухих клеток, либо количество клеток);

S – количество потребленного субстрата в весовых единицах.

Влияние лимитирующих факторов на скорость роста описывается уравнением Ж. Моно, если лимитирующим фактором является концентрация субстрата, или уравнением Н.Д. Иерусалимского, если необходимо учесть влияние продуктов обмена на рост. **Уравнение Моно:**

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S/(S + K_S), \quad (5)$$

где μ – удельная скорость роста;

μ_{\max} – максимальная удельная скорость роста;

S – концентрация субстрата;

K_S – константа насыщения, численно равная такой концентрации субстрата, которая обеспечивает скорость роста, соответствующую половине значения μ_{\max} .

Уравнение Н.Д. Иерусалимского:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S/(S + K_S) \cdot K_P / (K_P + P), \quad (6)$$

где P – концентрация продуктов обмена;

K_P – константа, численно равная такой концентрации продуктов обмена, при которой скорость роста замедляется вдвое.

Когда $K_P \gg P$, величиной P можно пренебречь, скорость роста ограничена только концентрацией субстрата. Если $S \gg K_S$, то скорость роста лимитирована накоплением продуктов обмена.

2.2.2. Непрерывное культивирование

Принцип проточного культивирования состоит в том, что в сосуд, где растут микроорганизмы, подается свежая пита-

тельная среда, и одновременно из него вытекает такой же объем культуры.

Непрерывные процессы имеют ряд преимуществ перед периодическими:

- возможность специализации аппаратуры для каждой операции;
- возможность стабилизации процесса во времени;
- улучшение качества продукта;
- легкость регулировки;
- возможность автоматизации;
- экономичность.

Выделяют две разновидности непрерывного культивирования: процесс полного вытеснения и процесс полного смешения.

Процесс полного вытеснения

Сосуд для выращивания (трубчатый ферментер) представляет собой трубку, расположенную горизонтально или вертикально, в которую с одной стороны вливаются среда и посевной материал, а с другой – вытекает культура, при этом перемешивание не происходит. По ходу трубки культура «стареет», субстрат исчерпывается, накапливаются продукты метаболизма, а вытекающая культура находится в состоянии, аналогичном стационарной фазе. Например, процессом полного вытеснения на производстве является анаэробная стадия при производстве пива в башенных проточных емкостях.

Процесс полного смешения

Рост культуры происходит в емкости – ферментере при интенсивном перемешивании, которое обеспечивается аэрацией или/и работой механической мешалки. При этом способе культивирования по всей массе культуры условия должны быть одинаковыми. Этот метод культивирования получил название гомогенно-непрерывного. Условия культивирования микроорганизмов при непрерывном процессе по типу полного смешения соответствуют одной точке на кривой роста. При больших потоках среды эти условия благоприятны для быстрого экспоненциального роста, а при малых – близки к стационарной фазе.

Скорость потока среды, отнесенная к единице объема культуры в ферментере, называется коэффициентом разбавле-

ния D . В большом диапазоне значений этот коэффициент соответствует удельной скорости роста μ :

$$D = F/V \text{ (ч}^{-1}\text{)}, \quad (7)$$

где D – скорость разбавления;

F – скорость притока свежей питательной среды ($\text{л} \cdot \text{ч}^{-1}$),

V – объем культиватора, л

Рост в хемостате

Хемостатное культивирование (рис. 2) – это вариант непрерывного проточного культивирования с заданным желаемым коэффициентом разбавления (D), от которого зависит скорость роста культур μ . При этом плотность популяции стабилизируется путем ограниченного снабжения бактерий тем или иным питательным субстратом.

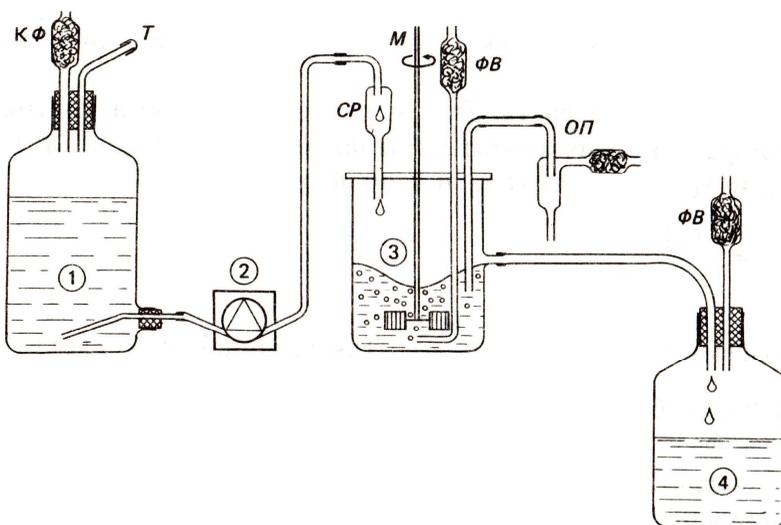


Рис. 2. Принцип культивирования в хемостате. 1 – сосуд с питательной средой, снабженный компенсационным фильтром (КФ) и трубкой для дозирования (Т); 2 – перистальтический насос; 3 – хемостат с притоком питательной среды (СР), мешалкой (М), фильтром для воздуха (ФВ) и приспособлением для отбора проб (ОП); 4 – приемный сосуд с фильтром для выходящего воздуха (ФВ) [URL: https://studopedia.ru/3_72288_kultivirovanie-mikroorganizmov.html]

Двустадийный хемостат – это последовательно соединенные два аппарата непрерывного культивирования, при котором среда, выходящая из первого аппарата, поступает во второй. Кроме того, во втором аппарате имеется дополнительная подпитка свежим субстратом.

Особенности двухстадийного хемостата:

- удельная скорость роста биомассы во втором аппарате не равна скорости разбавления, как в одностадийном хемостате;
- концентрация субстрата во втором аппарате всегда меньше, чем в первом;
- концентрация биомассы во втором аппарате всегда больше, чем в первом;
- общая продуктивность системы не превышает суммарной продуктивности двух параллельно работающих одностадийных хемостатов;
- последующие аппараты должны более интенсивно аэрироваться.

Двустадийный хемостат удобен для процессов, в которых целевым продуктом является продукт метаболизма. В этом случае в первом аппарате поддерживают условия, оптимальные для роста микроорганизмов, во втором – для биосинтеза продуктов метаболизма.

Рост в турбидостате

Турбидостат (от лат. *turbid(us)* – мутный и греч. *stat(ikos)* – останавливающий) – это установка для непрерывного гомогенного культивирования микроорганизмов, в которой плотность биомассы поддерживается на определенном уровне с помощью нефелометра, регулирующего скорость подачи свежей среды и постепенное удаление избытка биомассы (рис. 3). Отличие хемостата от турбидостата заключается в том, что в хемостате скорость разбавления задается экспериментатором, а в турбидостате – контролируется петлей обратной связи.

Ниже представлены варианты непрерывного культивирования микроорганизмов, работающие по принципу турбидостата.

pH-стат. Активный рост микроорганизмов часто сопровождается закислением культуральной среды, в то время как

замедление роста при недостатке субстрата вызывает защелачивание. Следовательно, величина рН может использоваться как параметр, в зависимости от которого в аппарат подается питательная среда. Скорость подачи регулируется таким образом, чтобы величина рН поддерживалась на некотором постоянном уровне. При этом исключают регулирование рН подачей в аппарат щелочи или кислоты.

Нутростат. При этом способе управления подача питательной среды в аппарат осуществляется так, чтобы поддерживать заданное значение концентрации субстрата на постоянном уровне, для обеспечения максимальной скорости роста.

Теплостат. В обычных условиях культивирования температуру поддерживают на уровне оптимальной. Обычно это обеспечивается путем регулирования подачи охлажденной воды в рубашку или змеевик аппарата. Когда при увеличении теплового потока повышается температура, регулятор увеличивает скорость подачи охлаждающей воды.

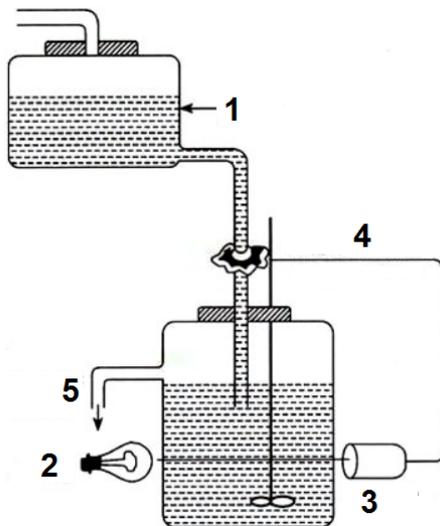


Рис. 3. Принцип культивирования в турбидостате: 1 – сосуд с питательной средой; 2 – источник света; 3 – фотоэлемент; 4 – контроллер потока среды; 5 – слив [URL: <http://www.soilmanagementindia.com>]

Респиростат. Способ управления основан на использовании в качестве датчиков газоанализаторов кислорода или углекислого газа, измеряющих интенсивность дыхания культуры. Эта величина пропорциональна росту, образованию продукта и поддержанию жизнедеятельности клеток, т.е. пропорциональна концентрации биомассы. Поэтому, регулируя интенсивность дыхания, можно регулировать концентрацию биомассы и, следовательно, скорость подачи субстрата (D).

Оксистат. В этом способе управления подачу питательной среды в аппарат (скорость разбавления) осуществляют таким образом, чтобы поддерживать постоянное, относительно малое значение концентрации растворенного кислорода в среде, поскольку при минимальной концентрации растворенного кислорода достигается максимальная величина его потребления клетками микроорганизмов.

2.2.3. Твердофазное культивирование

Твердофазное культивирование (ТФК) – это микробный процесс, при котором твердый нерастворимый в воде материал является субстратом или инертным материалом, на котором растут клетки. При ТФК микроорганизмы иногда растут лучше и образуют большее количество ферментов или метаболитов, чем при глубинном культивировании.

Основные различия погруженных и твердофазных культур:

1. При ТФК распространение микроорганизмов происходит по поверхности субстрата, перемешивание которого происходит неодинаково, следовательно, микроокружение культуры неоднородно.
2. Содержание влаги в субстрате обычно ниже, но если среда имеет высокую влажность, то аэрация через толщу субстрата затруднительна.
3. Обычно используют субстраты природного происхождения (пшеница, соевые бобы, отходы сельского хозяйства), при этом иногда весь продукт подвергается ферментации.

4. Биологический объект, который выращивают методом ТФК – это чаще всего грибы. При ТФК их мицелий дифференцируется на воздушный и субстратный с различной физиологической активностью, что затрудняет контролирование процесса.
5. Перемешивание слоя субстрата трудноосуществимо, поэтому культивирование обычно проводят в стационарном состоянии.

ТФК имеет свои преимущества перед другими видами культивирования, но при этом не лишен недостатков (табл. 1).

Таблица 1.

Преимущества и недостатки ТФК

Преимущества	Недостатки
Процесс устойчив к бактериальному заражению	Бактерии выращивать таким способом затруднительно, т.к. влажность недостаточна
Объемная загрузка по субстрату гораздо выше, чем при глубинном культивировании	Перемешивание субстрата затруднено, физико-химические параметры среды неоднородны
Экстракция продукта требует меньше растворителя, чем при глубинном культивировании	Факторы, влияющие на продуктивность ТФК, не ясны
Использование микроорганизмами газообразного кислорода снижает затраты на аэрацию процесса	Контролировать температуру трудно, можно только усилением аэрации
Стабильный посевной материал (споры)	Быстро определить параметры роста очень трудно
Остатки субстрата могут быть высушены и использованы в качестве кормовой добавки или удобрения	Трудно обеспечить непрерывный процесс и автоматизацию

Для ТФК используют ферментеры следующих типов:

- **Многолотковые ферментеры.** Культивирование проводят в подносах без механического перемешивания. Подносы помещают в инкубационную комнату, в которой контролируют влажность и температуру.
- **Ферментеры с упакованным слоем субстрата.** Ферментер может быть снабжен смесителями для перемешивания субстрата.
- **Ферментеры с вращающимися барабанами.** Позволяют перемешивать и увлажнять субстрат с определенными интервалами.
- **Ферментеры смачиваемого слоя.** В ферментерах такого типа смачивание субстрата происходит влажным воздухом, который поступает снизу слоя субстрата.

2.3. Масштабирование процессов ферментации

Масштабирование – это воспроизведение результатов, полученных на оборудовании одного размера или конструкции, при проведении того же процесса в аппаратах другого размера или конструкции.

Проблемы масштабирования всегда остро стоят при внедрении результатов научно-исследовательской деятельности в производственный процесс. Эффект, полученный при проведении процесса в малом объеме, например в колбе, может значительно отличаться от такового в крупномасштабном оборудовании. Так как ферментация осуществляется микроорганизмами, то особенности ее протекания в аппаратах, отличающихся по масштабу и конструкции, следует искать в микроокружении микробных клеток. Различия при ферментации в аппаратах разного объема и конструкции могут заключаться в концентрациях растворенного кислорода, что, в свою очередь, влияет на процессы жизнедеятельности микроорганизмов. Чтобы повлиять на концентрацию растворенного кислорода в жидкости, необходимо изменить скорость продувания воздуха через аппарат или частоту вращения мешалки, либо давление в аппарате.

Кроме того, на клетки микроорганизмов могут механически воздействовать силы сдвига, действующие у краев ме-

шалки или отбойников. Такое механическое воздействие может вызвать разрушение клеток. К подобным воздействиям более чувствительны мицелиальные микроорганизмы, а также растительные и животные клетки.

Масштабирование можно осуществлять «снизу вверх», т.е. процесс, разработанный для оборудования меньшего масштаба, адаптируют для его осуществления в крупном масштабе. И наоборот, масштабирование может осуществляться «сверху вниз», когда процесс лабораторного уровня «подстраивают» под требования промышленного масштаба и обрабатывают технологические условия и требования.

При конструировании биореакторов необходимо решать задачу обеспечения аэробной культуры кислородом и наоборот, удаления кислорода при работе с анаэробной культурой. Также необходимо поддерживать температуру культуральной среды на уровне, соответствующем оптимуму активности данных микроорганизмов. Если температура ниже оптимальной, то скорость роста микроорганизмов снижается. При температуре, всего лишь на несколько градусов превышающей этот оптимум, рост может полностью прекратиться, а микроорганизмы могут потерять свою жизнеспособность. Если температурный оптимум микроорганизмов лежит ниже 40°C, то на охлаждение будет приходиться основная часть производственных расходов.

Пенообразование также является проблемой промышленного культивирования микроорганизмов. Сильное пенообразование наблюдается в процессе выращивания аэробных микроорганизмов, сопровождающемся подачей воздуха и перемешиванием среды. Возникновение пены в процессе биосинтеза обусловлено как введением газовой фазы, так и содержанием в среде питательных субстратов, солей, продуктов метаболизма микроорганизмов и поверхностно-активных веществ. В этом случае используют различные пеногасители. Антивспенивающие агенты образуют на границе раздела жидкой и газовой фазы нерастворимую в жидкости непроницаемую плёнку, повышая поверхностное натяжение и предотвращая образование пузырьков газа.

2.4. Хранение микроорганизмов

Основными задачами хранения микроорганизмов является поддержание их жизнеспособности и сохранение таксономических признаков и свойств, важных для научных исследований и практического применения. Хранение микроорганизмов производится в специальных коллекциях типовых культур следующими методами:

- 1) периодическими пересевами;
- 2) в условиях низких и ультранизких температур;
- 3) лиофилизацией;
- 4) под минеральным маслом.

Периодические пересевы. Преимуществом метода периодических пересевов являются простота и удобный визуальный контроль чистоты культуры, а также возможной морфологической изменчивости колоний (например, образование R- и S-вариантов, атипичных колоний). Недостатками метода считаются возможность заражения, краткосрочность хранения, трудоемкость работы и большой расход реактивов, входящих в состав питательных сред. Например, молочнокислые бактерии во время периодических пересевов часто утрачивают свои ценные производственные свойства, а актиномицеты и мицелиальные грибы при частых пересевах на богатые питательные среды могут снижать или полностью утрачивать способность к образованию антибиотиков. Методом периодических пересевов (субкультур) в коллекциях обычно поддерживают ряд бактерий, включая чувствительные к хранению спирохеты, микоплазмы, а также дрожжи, мицелиальные грибы, водоросли, простейшие.

Хранение микроорганизмов при низких и ультранизких температурах. Для хранения при низких температурах используют густые суспензии микроорганизмов в криозащитной среде, предохраняющей их от возможных повреждений. Микроорганизмы хранят в рефрижераторах при температуре от -12 до -80°C . Для любого вида хранения микроорганизмы выращивают при оптимальных условиях до начала стационарной фазы. Микроорганизмы при периодическом культивировании в экспонен-

циальной фазе роста обычно более чувствительны к холодовому шоку, чем в стационарной фазе. Споры более устойчивы к замораживанию, чем вегетативные клетки. Грамположительные бактерии обычно более устойчивы к замораживанию, чем грамотрицательные. Преимущества метода криогенного хранения состоят в малой вероятности заражения культуры, стабильности свойств микроорганизмов, малых временных затратах, экономичном расходе материалов при подготовке культуры к хранению. Клетки можно легко извлечь из рефрижератора и использовать без пересевов в качестве инокулята. В качестве трудностей метода нужно отметить необходимость контроля работы специального рефрижератора.

Лиофилизация. Лиофилизация заключается в высушивании клеток из замороженного состояния под вакуумом по типу сублимации, минуя жидкую фазу. В настоящее время лиофилизация широко используется для длительного (более 30 лет) хранения бактерий, включая актиномицеты и микоплазмы, а также мицелиальных грибов, дрожжей, водорослей, простейших, вирусов, вакцин и плазмы крови. В процессе лиофилизации микроорганизмы подвергаются действию различных стрессов, в том числе замораживания, высушивания и регидратации. Выживаемость лиофилизированных микроорганизмов зависит от специфической чувствительности вида и штамма, стадии роста культур, концентрации клеток, состава защитных сред, режима лиофилизации, условий хранения (температура, газовая атмосфера, свет), условий реактивации (состав среды для регидратации, показатель активности воды, продолжительность хранения).

Контрольные вопросы

1. Из каких стадий состоит типовая схема биотехнологических производств?
2. Какие выделяют виды продуктов по их месту в типовой технологической схеме?
3. Что такое ферментация?
4. По каким принципам классифицируют процессы ферментации?

5. На какие типы подразделяются процессы культивирования микроорганизмов?
6. Что такое периодическое культивирование? Какие фазы роста микроорганизмов выделяют при периодическом культивировании?
7. Как определить удельную скорость роста микроорганизмов?
8. Что такое урожай биомассы, как он определяется?
9. Что такое экономический коэффициент потребления субстрата?
10. В чем отличие уравнений Ж. Моно и Н.Д. Иерусалимского от классического уравнения, описывающего удельную скорость роста микробной культуры?
11. В чем состоит принцип непрерывного культивирования? Какие две разновидности непрерывного культивирования выделяют?
12. В чем отличие хемостата от турбидостата?
13. Что такое твердофазное культивирование?
14. В чем отличия погруженных и твердофазных культур?
15. Каковы преимущества и недостатки твердофазного культивирования?
16. Какие типы ферментеров используют для твердофазного культивирования?
17. Что такое масштабирование процессов ферментации, каковы основные проблемы масштабирования?
18. Какие способы хранения микроорганизмов Вы знаете? В чем особенности каждого способа?

Глава 3. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЧИСТКЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Одной из основных проблем человечества является проблема отходов. Ее решением может быть создание замкнутых производственных циклов, использование альтернативных энергоресурсов и повсеместное внедрение биологической переработки.

3.1. Очистка сточных вод

Очистка сточных вод является одним из древних биотехнологических процессов. Комплекс мероприятий по удалению загрязнений из вод перед выпуском в водоемы включает в себя не только механическую и физико-химическую, но и биологическую очистку, основанную на биохимической деятельности микроорганизмов, поэтому по праву относится к биотехнологиям. Сточные воды бывают:

- технологические, возникающие в процессах промывки, при использовании воды в качестве растворителя либо носителя в производственных процессах;
- хозяйственно-бытовые (коммунальные), образующиеся в жилищно-бытовом секторе;
- поверхностные, формирующиеся за счет дождевых и талых снеговых вод, при мокрой уборке территорий с искусственными покрытиями.

Среди способов очистки сточных вод выделяют

- механический
- физико-химический
- химический
- биологический.

При механической очистке из производственных и бытовых сточных вод путем процеживания, отстаивания и фильтрования удаляются нерастворимые механические примеси различной степени дисперсности. Для этих целей применяют решетки, песколовки, песчаные фильтры, отстойники различных типов. Вещества, плавающие на поверхности сточных вод (нефть, смолы, масла, жиры, полимеры и др.), задерживают

нефте- и маслотовушками (рис. 4) и другого вида уловителями либо выжигают.

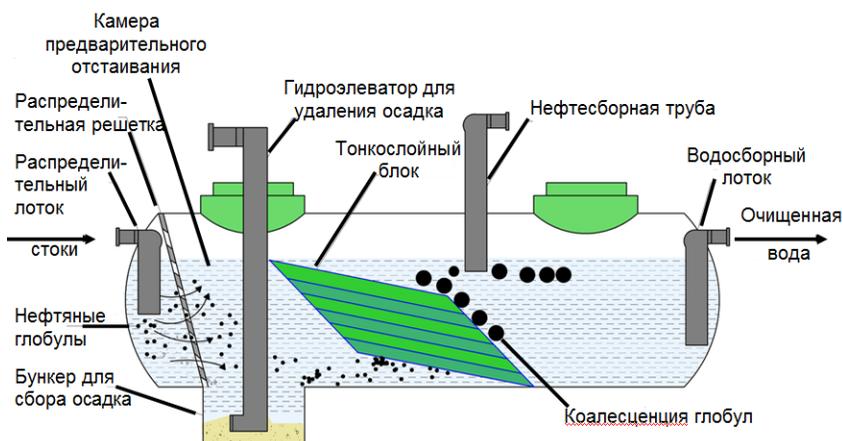


Рис. 4. Нефтеловушка

[URL: <http://www.voronezh-aqua.ru/products/vodopodgotovka/neftelovushki/>]

Среди **физико-химических способов** очистки выделяют

- коагуляцию (от лат. *coagulo* – вызываю свёртывание, сгущение) – введение в сточные воды веществ-коагулянтов, (солей аммония, железа, меди, шламовых отходов и пр.) для образования хлопьевидных осадков, которые затем легко удаляются;
- сорбцию – поглощение загрязнений адсорбентами (активированным углем, бентонитовыми глинами, цеолитами, силикагелем, торфом и др.);
- флотацию – пропуск через сточные воды пузырьков воздуха, которые захватывают при движении вверх поверхностно-активные вещества, нефть, масла, другие загрязнения и образуют на поверхности воды легко удаляемый пенообразный слой.

К основным химическим способам очистки сточных вод относят

- нейтрализацию, заключающуюся в том, что в сточные воды в зависимости от их рН вводят реагенты – известь,

кальцинированную соду, аммиак в кислые воды, либо сернистый и углекислый газ в щелочные стоки;

- окисление, смысл которого состоит в обезвреживании токсичных загрязнителей, обладающих восстановительными свойствами;
- осаждение, использующееся для удаления ионов металлов в виде нерастворимых гидроксидов.

Биологическая очистка сточных вод подразделяется на аэробную и анаэробную. Аэробная биологическая очистка протекает в *перколяционных фильтрах* (от лат. *percōlāre* – просачиваться, протекать), в которых микроорганизмы в виде биопленки растут на поверхности загрузкиочного материала фильтра (кирпич, камень, гравий, песок, пластмассы и др.) (рис. 5) и в *аэротенках* – в резервуарах, где сточная вода непрерывно аэрируется и смешивается с активным илом (рис. 6).



Рис. 5 Биофильтр [URL: <http://vpk-yar.ru/products/filtrovalnaya-zagruzka/ochistka-stochnyh-vod-biofiltraciya/>]



Рис. 6. Аэротенк [URL: <http://acs-nnov.ru/aerotenki-cxemi-ochistki.html>]

Активный ил – это сообщество живых организмов, состоящее из микроорганизмов: прокариотов, грибов, простейших (амеб, жгутиковых и ресничных инфузорий), микроскопических животных (коловраток, круглых червей нематод, водных клещей). Активный ил представляет собой взвешенные в воде бурожелтые хлопья размером 3–150 мкм, образованные колониями микроорганизмов (рис. 7). Живые организмы вместе с твердым носителем, к которому они прикреплены, образуют так называемый **зооглей** – симбиоз популяций организмов, покрытый общей слизистой оболочкой, который может формироваться как за

счет флокуляции, так и адгезии клеток на поверхности нерастворимых частиц. Структура и свойства хлопьев активного ила, которые можно отделить от воды путем седиментации, определяют эффективность и качество биологической очистки. Основными компонентами слизистой матрицы хлопьев активного ила являются внеклеточные полимерные вещества. На флокулирующую активность микроорганизмов влияет гидрофобность и заряд поверхности, состав внеклеточных полимерных веществ и состав питательной среды.

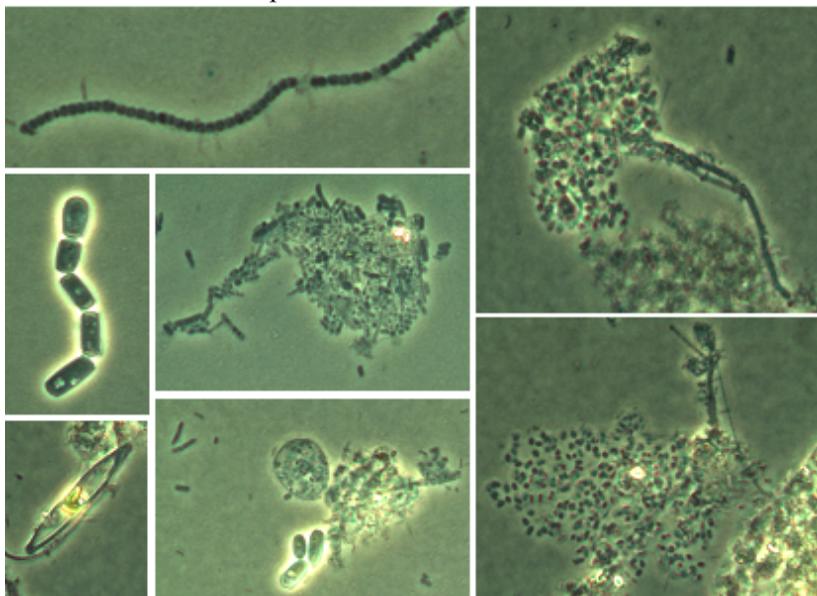


Рис. 7. Биоразнообразие активного ила из аэротенка биологических очистных сооружений г. Перми (фазово-контрастная микроскопия)

Принцип действия аэробных систем биологической очистки базируется на методах проточного культивирования. Аэробную переработку стоков можно подразделить на несколько этапов:

- 1) адсорбция субстрата на клеточной поверхности микроорганизмов;
- 2) расщепление адсорбированного субстрата внеклеточными ферментами;

- 3) поглощение растворенных веществ клетками;
- 4) рост и эндогенное дыхание;
- 5) высвобождение экскретируемых продуктов;
- 6) «выедание» первичной популяции организмов вторичными потребителями.

Аэробная биологическая очистка складывается из двух этапов: минерализации (окисления углеродсодержащей органики до простых соединений, углекислого газа и воды) и нитрификации. Появление в очищаемых стоках нитратов и нитритов свидетельствует о глубокой степени очистки.

Микроорганизмы активного ила подразделяются на несколько основных групп:

- углеродоокисляющие флокулообразующие (необходимы для образования стабильных глобул, способных к осаждению);
- углеродоокисляющие нитчатые (их преобладание приводит к плохому осаждению ила и пенообразованию);
- нитрификаторы (окисляют аммонийный азот до нитратного через нитрит).

Среди физиологических групп микроорганизмов активного ила выделяют углеводородокисляющие, аммонифицирующие, нитрифицирующие, денитрифицирующие, серобактерии, сульфатредуцирующие и др. Среди экологических групп микроорганизмов можно выделить аэробов и анаэробов, термофилов и мезофилов, галофилов и несолеустойчивых организмов.

В аэробных реакторах происходит селекция микроорганизмов по отношению к кислороду, питательному субстрату и способности к осаждению. Так, если организм аэробный, использует первичный или вторичный субстрат, осажается или образует флокулы, выживает при температуре сточной воды и обладает достаточной скоростью роста, то он закрепляется в сообществе активного ила и функционирует в нем, в противном случае организм либо погибает, либо вымывается из аэротенка вместе с очищаемой водой.

Для описания процессов очистки сточных вод активным илом и степени загрязненности стоков вводятся следующие показатели: иловый индекс, химическое потребление кислорода (ХПК), биологическое потребление кислорода (БПК).

Иловый индекс – это объем иловой смеси, приходящийся на один грамм сухого вещества активного ила, полученный после его отстаивания в течение 30 мин. Для его определения пробу иловой суспензии помещают в мерный литровый цилиндр и через 30 мин. замеряют объем осадка в см³ и делят его на массу ила в граммах, содержащегося в 1 дм³. Иловый индекс является показателем способности активного ила к осаждению, то есть характеризует его седиментационные свойства.

При высоких значениях илового индекса активный ил будет выноситься из вторичного отстойника вместе с очищенной водой, ухудшая степень ее очистки. Низкие значения означают, что в активном иле повышается доля тяжелых элементов с более высокой зольностью, могут содержаться взвешенные частицы с высокой плотностью. Такой ил обладает хорошими седиментационными свойствами, однако для него характерна низкая скорость прироста биомассы. Оптимальные показатели находятся в диапазоне от 70 до 120 см³/г.

Химическое потребление кислорода (ХПК) – это показатель содержания органических веществ в воде. Он выражается в миллиграммах кислорода (или другого окислителя в пересчете на кислород), пошедшего на окисление органических веществ, содержащихся в 1 л воды, т. е. это такая масса окислителя, которая необходима, чтобы весь С, Н, S, Р органического вещества окислился до СО₂, Н₂О, Р₂О₅, SO₃, а азот – до аммонийной соли.

Биологическое (биохимическое) потребление кислорода (БПК) – это количество кислорода, израсходованное на аэробное биохимическое окисление под действием микроорганизмов.

Определяют БПК₅ и БПК₂₀ (БПК_{полн}) – количество кислорода, ушедшее за установленное время без доступа света при 20°С на окисление загрязняющих веществ, содержащихся в единице объема воды.

3.1.1. Очистка сточных вод от соединений азота

Нитрификация и денитрификация. Аммонийный азот – один из основных биогенных элементов, содержащийся в сточных водах. Основным процессом, используемым в очистке

стоков от соединений азота, является процесс нитрификации-денитрификации, который заключается в окислении аммония до нитрата с одновременной ассимиляцией углекислоты (нитрификация) и последующим восстановлением нитрата и нитрита до газообразного азота (денитрификация). Этот процесс требует затрат на аэрацию и добавление источника органических веществ (внесение доноров электронов) для роста микроорганизмов-денитрификаторов.

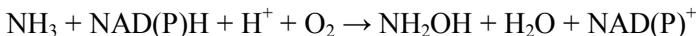
Технологии нитри/денитрификации применяются при очистке стоков с высоким содержанием органики и низким содержанием азота, например, коммунально-бытовых сточных вод. Аммоний окисляется до нитрата в аэротенках в процессе аэробной очистки, а органическое вещество для денитрифицирующих бактерий добавляют с возвратной водой метантенка (вода после декантации избыточного ила, обработанного в метантенке) или в виде экзогенного источника органического углерода (метилового или этилового спиртов).

Нитрифицирующие хемолитоавтотрофные бактерии могут окислять аммиак, гидроксилламин, нитрит и другие неорганические соединения азота. Окисление аммония до нитрата происходит в два этапа: нитрозобактерии окисляют аммоний до нитрита, после чего нитробактерии окисляют нитрит до нитрата. Среди нитрозобактерий наиболее важными представителями являются *Nitrosococcus oceanus*, *Nitrosolobus multiformis*, *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosovibrio tenuis*; среди нитробактерий – *Nitrobacter* sp., *Nitrococcus mobilis*, *Nitrospina gracilis*, *Nitrospira marina*. Ферменты окисления аммония и нитрита локализованы в развитой системе внутриклеточных мембран нитрифицирующих бактерий.

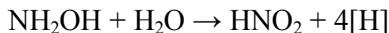
Суммарный процесс полного окисления аммония до нитрата с участием кислорода можно представить следующей схемой:



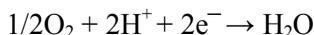
Первый этап окисления аммония катализируется монооксигеназой и приводит к образованию гидроксиламина путем включения атома кислорода в молекулу аммония:



Окисление гидроксилamina катализирует гидроксилamинокси-доредуктаза, которая при этом восстанавливает периплазматический цитохром C:



Окисление нитрита до нитрата нитрит:нитрат-оксидоредуктазой осуществляется в два этапа:



Образование молекулярного азота происходит при денитрификации. В процессе анаэробного дыхания денитрифицирующие бактерии окисляют органические вещества нитритом или нитратом с образованием молекулярного азота. В качестве источника углерода денитрифицирующие бактерии используют органические вещества. Способность к денитрификации обнаружена у бактерий, принадлежащих к разным физиологическим группам: фототрофам (*Rhodospseudomonas sphaeroides*), хемолитотрофам (*Thiobacillus denitrificans*, *Paracoccus denitrificans*), грамположительным и грамотрицательным факультативным анаэробам (виды родов *Pseudomonas*, *Bacillus* и др.).

Систему нитрификации/денитрификации можно схематично представить следующим образом (рис. 8): 1-я анаэробная стадия очистки предназначена для удаления нитрата путем его восстановления до молекулярного азота денитрификаторами-гетеротрофами в процессе нитратного дыхания с использованием органических веществ; на 2-й аэробной стадии происходит аэробное окисление остаточного органического вещества; на 3-й аэробной стадии при участии автотрофных нитрификаторов происходит окисление аммония и нитрита. Вода, очищенная от органического вещества, но обогащенная в результате нитрификации нитратом, возвращается на вход очистных сооружений для удаления нитрата. Часть активного ила, отделяемого на каждой стадии в отстойнике, возвращается в предыдущий реактор для восстановления биомассы микроорганизмов.

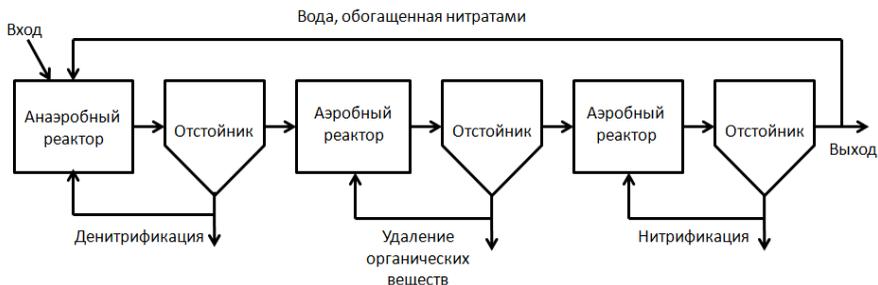
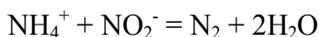
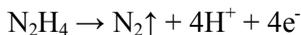
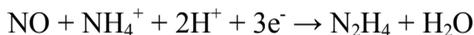
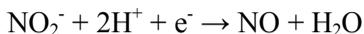


Рис. 8. Схема системы очистки сточных вод [Современная микробиология. Прокариоты. Т.1 / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля, М.: Мир, 2005]

Анаммокс-процесс. Долгое время считали, что микробное окисление аммония может происходить только в аэробных условиях. Однако в 70-е гг. XX в. с помощью термодинамических расчетов было показано, что аммоний может быть окислен до молекулярного азота в анаэробных условиях при использовании нитрита в качестве акцептора электронов. В конце 80-х гг. XX в. возможность микробного анаэробного процесса окисления аммония была доказана экспериментально. Этот процесс получил название анаммокс (ANAMMOX – ANaerobic AMMonia OXidation). В результате этого процесса аммоний окисляется нитрит-ионом с образованием молекулярного азота по следующему суммарному уравнению:



Позапно процесс протекает следующим образом:



В анаммокс-процессе образуется токсичный для клетки гидразин. Это единственный случай образования подобного вещества у живого организма (гидразин – компонент ракетного топлива). Следует отметить, что гидразин не контактирует с цитоплазмой, а находится в вакуоли (наличие вакуолей – это также достаточно редкий случай в мире прокариот).

Описанные к настоящему времени анаммокс-бактерии являются представителями фила *Planctomycetes*. Анаммокс-организмы выделены из различных водных сред: промышленных стоков и осадков, морских и пресноводных осадков, вод Мирового океана. Первый анаммокс-организм был назван *Candidatus «Brocadia anammoxidans»*. Анаммокс-бактерии – анаэробные хемолитотрофы, получают энергию за счет окисления аммония нитритом и используют углекислый газ в качестве источника углерода в конструктивном метаболизме. Характеризуются крайне низкой скоростью роста, у наиболее «быстрорастущих» время генерации составляет 11–13 сут., а у некоторых представителей достигает 100 сут. Также эти бактерии обладают рядом морфологических особенностей. Клетки кокковидной или нерегулярно изрезанной формы диаметром около 1 мкм имеют кратерообразные структуры на поверхности. Ранее считали, что их клеточная стенка не содержит пептидогликан, а в клетке находится структура, напоминающая ядро, однако впоследствии эти утверждения оказались неверными. Уникальным свойством данных бактерий является присутствие внутриклеточной вакуоли – «анаммоксосомы», занимающей 50–70% объема клетки (рис. 9). Клетки обладают развитой системой внутрицитоплазматических мембран, внутренняя мембрана отграничивает область цитоплазмы, не содержащую РНК – парифолазму от рибоплазмы (области цитоплазмы с большим количеством рибосом).

Анаммоксосома осуществляет следующие важные функции (рис. 10):

- 1) является центром локализации ферментов процесса анаммокса;
- 2) защищает микроорганизм от диффузии протонов и токсичных промежуточных продуктов метаболизма, в первую очередь, гидразина;
- 3) является генератором энергии, на ее мембране происходит синтез АТФ за счет создания трансмембранного потенциала при транспорте протонов через мембрану.

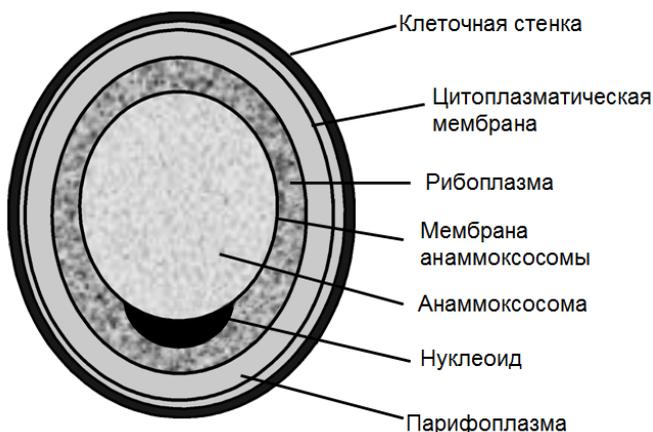


Рис. 9. Строение клетки анаммокс-бактерии [Анюшева, Калужный, 2007]

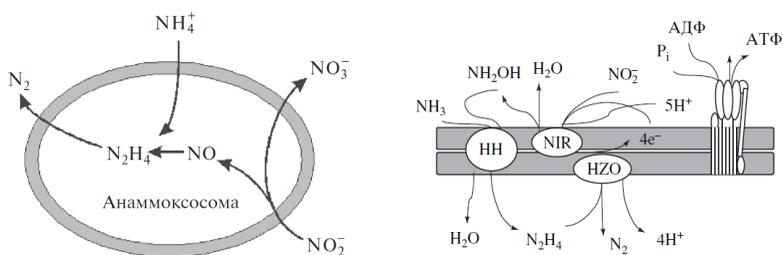


Рис. 10. Модель анаммокс-реакции [Анюшева, Калужный, 2007; Каллистова и др., 2016]

Требования к процессу анаммокс:

- 1) стоки должны содержать высокие концентрации аммония и низкие концентрации органического вещества;
- 2) в реакторе должен отсутствовать кислород или его содержание должно быть невысоким;
- 3) биомасса анаммокс-бактерий должна быть достаточной.

Открытие процесса АНАММОКС радикально повлияло не только на развитие биотехнологии очистки сточных вод, но и изменило представления о биологическом цикле азота. Биологический цикл азота с учетом этого процесса можно представить следующим образом (рис. 11).

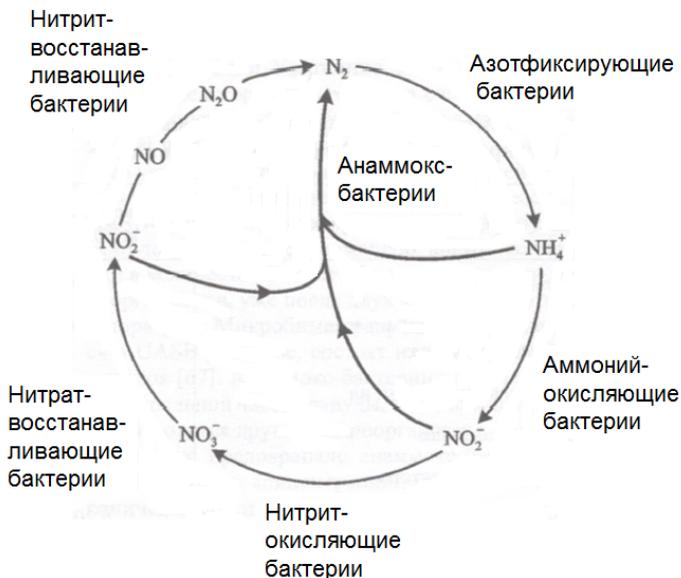


Рис. 11. Микробный цикл азота [Ножевникова и др., 2011]

Таким образом, если в сточных водах много органических веществ, мало азота и условия аэробные, преобладает процесс нитрификации-денитрификации (например, сточные воды муниципального хозяйства). Если в стоках мало органики, много азота и мало кислорода, создаются благоприятные условия для анаммокс-процесса (стоки ряда промышленных предприятий, животноводческих и птицеводческих хозяйств, иловые воды метантенков, фильтрационные воды полигонов захоронения твердых бытовых отходов). Использование анаммокс-процесса позволяет исключить стадию денитрификации и значительно уменьшить стоимость аэробной нитрификации, в результате может быть сэкономлено до 25% от общих затрат, на 40% снижены затраты по внесению органического вещества, а выбросы углекислого газа уменьшены на 20%. Основной проблемой этого процесса является наращивание достаточной биомассы медленнорастущих бактерий, осуществляющих анаэробное окисление аммония.

3.1.2. Очистка сточных вод от соединений фосфора

Принцип химической обработки стоков для удаления фосфора состоит в образовании нерастворимых фосфатно-реагентных комплексов, выпадающих в осадок, и сорбирования нерастворимых соединений фосфора хлопьями гидроокисей. Химические методы удаления фосфора имеют определенные недостатки, среди которых удорожание процесса, зависимость от общей концентрации фосфора в стоке, внесение дополнительных химических веществ, повышающих концентрацию солей в эффлюенте. Поэтому большие перспективы имеет биологическое удаление фосфора из стоков.

Биологическое удаление фосфора из сточных вод осуществляется двумя основными путями:

- 1) в ходе роста обычных аэробных микроорганизмов, участвующих в процессах биохимической очистки сточных вод (не фосфат-аккумулирующих микроорганизмов);
- 2) в ходе жизнедеятельности фосфат-аккумулирующих микроорганизмов, которые потребляют значительно больше фосфора, чем необходимо на их рост. Эти микроорганизмы используют дополнительный фосфор в качестве энергетического запаса, что позволяет им потреблять субстрат в анаэробных условиях. Восполнение израсходованного фосфата происходит в аэробных условиях. Основная роль в реализации процесса «жадного поглощения фосфора» принадлежит бактериям рода *Acinetobacter*.

Реализация процесса биологического удаления фосфора связана с созданием в аэротенке трех типов зон:

- аэробная зона с высокой концентрацией растворенного кислорода, где протекают процессы аэробной очистки от органических веществ, нитрификация и дефосфотация;
- аноксидная зона, где растворенный кислород практически отсутствует, но есть нитраты, а также органические вещества, и где происходит процесс денитрификации;
- анаэробная зона, где нет растворенного кислорода, нитратов и нитритов, но есть органические вещества, и идет сбразивание органических веществ до ацетата, который потребляется фосфат-аккумулирующими бактериями с выделением в среду фосфатов.

В аэробных условиях фосфат-аккумулирующие бактерии синтезируют биомассу, используя в качестве источника углерода полигидроксibuтират, запасенный в анаэробных условиях. При этом в клетках синтезируются полифосфаты, что обеспечивает высокое потребление фосфора из сточных вод. В анаэробной зоне гетеротрофные бактерии, которые не обладают способностью к аккумуляции фосфатов, сбраживают органические вещества до ацетата. Фосфат-аккумулирующие бактерии потребляют ацетат и синтезируют из него полигидроксibuтират, используя для синтеза энергию, выделяющуюся при гидролизе внутриклеточных полифосфатов, а образующиеся при гидролизе полифосфатов ортофосфаты выделяются в среду (Рис. 12).

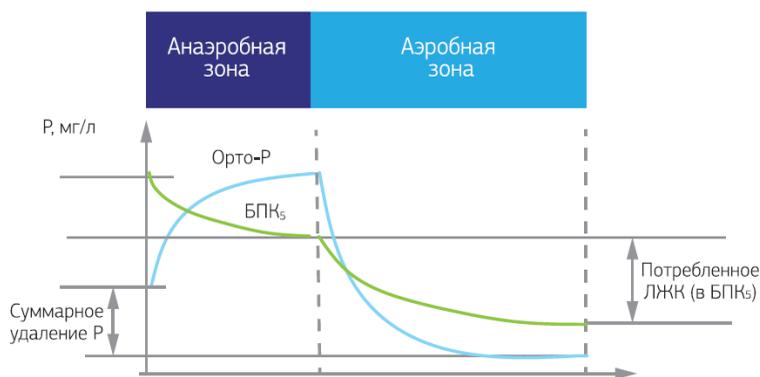
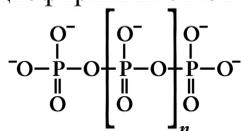


Рис. 12. Соотношение между поглощением и выделением фосфатов в аэробной и анаэробной зоне биореактора [Харькин, 2013]

Полифосфаты – это неразветвленные полимеры, состоящие из 100–1000 остатков неорганического фосфата, которые соединены фосфодиэфирными связями



Полифосфаты полифункциональны, служат резервуаром энергии и фосфора, являются эндогенным регулятором метаболизма, хелатируют катионы металлов. При недостатке АТФ выполняют роль фосфогена, при этом концевая фосфорильная

группа переносится на АДФ или на АМФ. Клетки бактерий запасают полифосфаты в виде гранул (рис. 13)

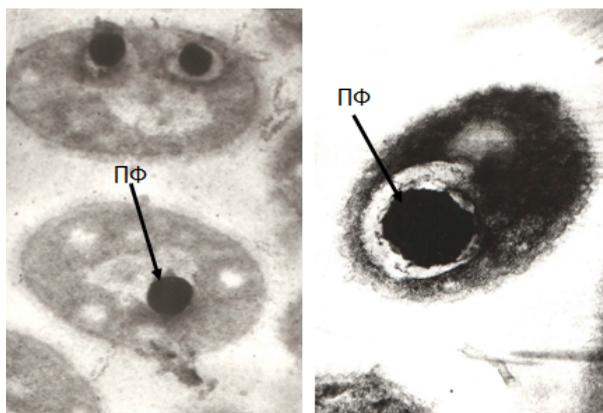


Рис. 13. Полифосфаты (ПФ) в клетках *Acinetobacter calcoaceticus*

Преимущество биологического удаления фосфора из сточных вод заключается в способности микроорганизмов поглощать фосфаты до очень низких концентраций в эфлюенте, а недостаток заключается в сложности управления процессом. Дело в том, что после поглощения фосфатов и накопления их в виде полифосфатов организмы способны осуществлять деградацию полифосфатов с выделением фосфатов в среду, поэтому в процессе очень важны дальнейшие манипуляции с активным илом. Для успешного применения этой биотехнологии недопустимо длительное пребывание активного ила в бескислородных условиях на стадиях его обработки для предотвращения выхода фосфора из клеток и его возврата в очищаемые воды.

3.1.3. Очистка сточных вод от соединений серы

Биологическая очистка серосодержащих сточных вод основана на превращении микроорганизмами неорганических и органических соединений серы в безвредные и малотоксичные продукты окисления. Основную роль в биологическом круговороте серы (рис. 14) играют две группы микроорганизмов:

- 1) образующие сероводород (гнилостные, сульфатредуцирующие, серовосстанавливающие бактерии);
- 2) окисляющие сероводород и неорганические соединения серы.

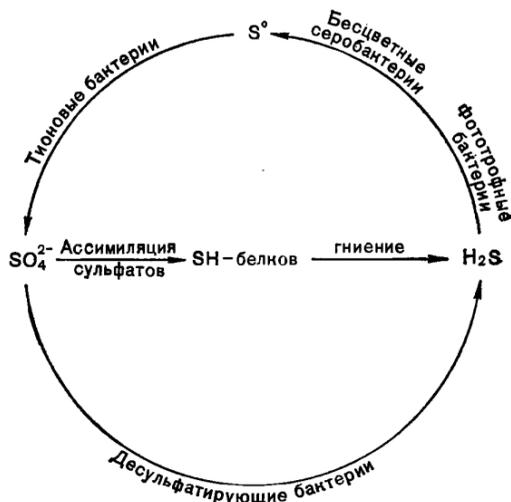


Рис. 14. Участие микроорганизмов в круговороте серы
 [URL: https://studbooks.net/908028/estestvoznanie/krugovorot_serj]

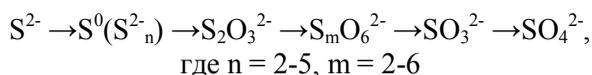
Среди микроорганизмов, окисляющих восстановленные неорганические соединения серы, можно выделить следующие группы:

- тионовые бактерии (*Thiobacillus*, *Thermothrix*, *Thiomicrospira*, *Thiosphaera* spp.);
- серобактерии (*Achromatium*, *Thiobacterium*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca* spp.);
- фотосинтезирующие пурпурные и зеленые серные бактерии, некоторые цианобактерии;
- хемоорганогетеротрофы (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Penicillium*, *Aspergillus* spp.)

Тионовые и серные бактерии окисляют одни и те же соединения, при отсутствии сероводорода в окружающей среде окисляют серу до тиосульфатов и далее до сульфатов. При этом тионовые бактерии откладывают серу вне своих клеток, а истинные серобактерии накапливают ее внутри клеток.

Известны хемоорганогетеротрофные микроорганизмы, участвующие в окислении сероводорода, молекулярной серы и тиосульфата. Окисление серы хемоорганогетеротрофами идет медленно и менее активно, при этом в качестве промежуточных продуктов образуется сероводород, метилмеркаптан, диметилсульфид и элементарная сера.

При полном бактериальном окислении серы должны образовываться сульфаты. Полный путь окисления сульфидов до сульфатов в нейтральной и слабощелочной среде представляет собой следующую последовательность превращений:



Формирование и накопление микробных сообществ сероокисляющих микроорганизмов определяют эффективность очистки сточных вод от соединений серы.

3.1.4. Основные проблемы биологической очистки сточных вод и пути их решения

Основными проблемами биологической очистки стоков является образование избытка активного ила и его «вспухание». «Вспухание» может вызываться:

- 1) серобактериями родов *Thiothrix*, *Beggiatoa* и др., возникает при наличии в очищаемых сточных водах токсичных веществ, снижающих ферментативную активность ила, нарушающих процессы флокуляции хлопьев ила;
- 2) бактериями рода *Sphaerotilus*, численность которых увеличивается при повышенном содержании легкоокисляемых органических веществ в сточных водах (сточные воды пищевой, консервной промышленности, пивоваренных и сахарных заводов);
- 3) цианобактериями, провоцируется сточными водами, дефицитными по питательным веществам (цианобактерии способны фиксировать азот воздуха и функционировать в среде с недостаточным содержанием биогенных веществ);
- 4) грибами;
- 5) обильно растущими зооглейными микроорганизмами.

Способом борьбы с «вспуханием» является повышение аэробности в аэротенках.

Избыточный активный ил – большая проблема биологических очистных сооружений. Его необходимо удалять и утилизировать, а это даже более трудоемкий процесс, чем сама очистка сточных вод. Стоимость его удаления может составить до 50% расходов, приходящихся на переработку сточных вод.

Предлагаются следующие способы утилизации:

- 1) складирование осадка сточных вод и избыточного активного ила с последующим использованием переработанных отходов в качестве технических грунтов;
- 2) использование твердых отходов очистных сооружений в качестве удобрения после предварительной обработки, включающей процессы обеззараживания и дегельминтизации или реакгентной детоксикации с последующим обезвоживанием и получением утилизируемого продукта – органо-минерального компоста;
- 3) анаэробная деструкция и обеззараживание с получением биогаза;
- 4) сжигание или термохимическая деструкция.

Все предлагаемые методы имеют свои недостатки: складирование и высушивание осадков и избытков активного ила на иловых площадках приводит к отчуждению больших территорий, кроме того, иловые площадки распространяют запах; строгие требования к органо-минеральному компосту, получаемому из активного ила; ил очистных сооружений некоторых промышленных предприятий не может быть использован в качестве удобрений из-за превышения допустимых показателей по ряду токсичных веществ; разработка технологий получения биогаза требует дополнительных вложений. В связи с этим проблема утилизации ила очистных сооружений остается очень актуальной.

При пуске очистных сооружений, аварийных ситуациях, при залповых выбросах загрязняющих веществ возможно внесение предварительно полученной биомассы микроорганизмов, обладающей определенными структурообразующими или метаболическими свойствами с целью улучшения свойств автохтонного микробного сообщества. Эти мероприятия называют

биоаугментацией. **Биоаугментация** (биоувеличение: греч. *bio(s)* – жизнь и лат. *augmentare* – увеличивать) – внесение в окружающую среду дополнительных природных или генно-инженерных микробных штаммов для достижения различных целей, например, биовосстановления земель и биоочистки. В случае биоаугментации активного ила это могут быть флокулообразующие и нитрифицирующие бактерии, деструкторы хлорированных углеводов и др. Такие бактерии накапливают в форме агрегатов (гранулы, биопленки) и вносят в системы биологической очистки.

Применение биоаугментации целесообразно в тех случаях, когда:

- необходимо, чтобы существующий биоценоз активного ила приобрел новый метаболический потенциал;
- необходимо ввести в эксплуатацию новые очистные сооружения либо восстановить их функции после каких-либо нарушений;
- вносимые культуры находятся в гранулированном состоянии или способны интегрироваться в структуру биопленки.

3.2. Очистка загрязненных почв

При разработке технологий очистки загрязненных почв руководствуются двумя подходами, позволяющими :

- 1) стимулировать развитие собственной микрофлоры (*биостимуляция*);
- 2) увеличить биодegradативный потенциал микрофлоры путем внесения биомассы селекционированных штаммов микроорганизмов (*биоаугментация*).

Эти подходы могут быть объединены. Биостимуляция предполагает проведение мелиоративных работ, внесение удобрений, структураторов, распашку земель для улучшения аэрации, полив. Выбор между этими подходами делается на основании свойств почвы и ряда других показателей (табл. 2).

Таблица 2

Выбор метода биологической очистки

<i>Биоаугментация</i>	<i>Биостимулирование</i>
Низкая численность микрофлоры в почвах с низким содержанием гумуса	Почвы с высоким содержанием гумуса
Незастарелые загрязнения, аварийные разливы (аборигенная микрофлора еще не адаптировалась к поллютантам)	Застарелые загрязнения (большая вероятность присутствия микроорганизмов-деструкторов)
Физико-химические условия неблагоприятны для роста природной микрофлоры (холодные климатические зоны, сухие почвы)	Невозможность больших капиталовложений в процесс очистки
Концентрация загрязнений в почве относительно высока, скорость деградации и/или остаточные концентрации поллютанта при разложении его аборигенной микрофлорой неудовлетворительны	Очень большие площади загрязнений

Восстановление свойств природных сред при ликвидации последствий загрязнений или при ослаблении воздействия на окружающую среду называется *ремедиацией*. Использование биотехнологий для очистки природных сред получило название *биоремедиации*. Технологии ремедиации подразделяются по методам и по месту обработки почвы (рис. 15). Биологические методы не могут быть использованы при концентрации загрязняющих веществ, достигающей или превышающей уровень токсичности для живых организмов. В этих случаях возможно применение только физических и физико-химических методов очистки.

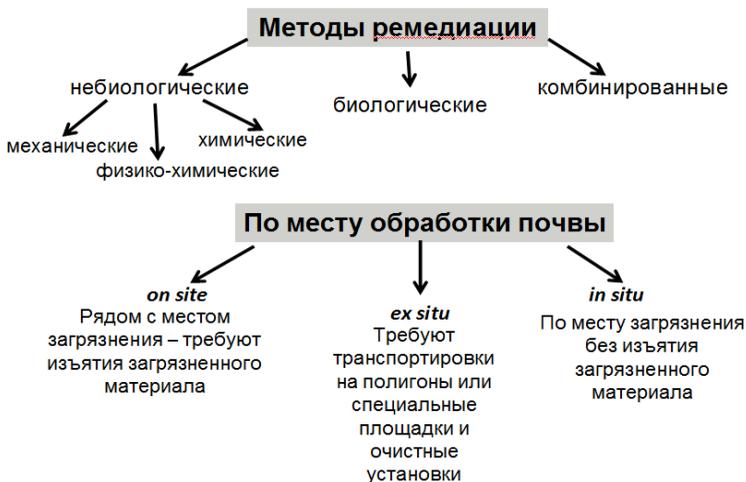


Рис. 15. Классификация методов и технологий ремедиации

Биоремедиация может осуществляться как с помощью микроорганизмов, так и с помощью растений. **Фиторемедиация** – это использование растений для очистки и восстановления почв, загрязненных грунтов и донных осадков. Выделяют следующие подходы:

- фитоэкстракция;
- фитодеградация;
- фитоиспарение;
- ризосферная биоремедиация;
- фитостабилизация;
- ризофилтрация.

При *фитоэкстракции* загрязнения поступают из почвы в растения через корневую систему, концентрируются в тканях наземных органов и удаляются из окружающей среды при сборе урожая растений. Загрязненную растительную массу можно высушить, сжечь, переработать компостированием, анаэробным сбраживанием, выщелачиванием, экстракцией растворителями, извлечь полезные компоненты, уплотнить, захоронить. В этом случае используют растения, накапливающие загрязнения в надземной массе.

Фитодеградация предполагает трансформацию загрязняющих веществ ферментативными системами растений, как

внутриклеточными ферментами, так и выделяемыми в окружающую среду. При этом полная минерализация этих веществ происходит редко, продукты их трансформации накапливаются в вакуолях клеток либо ковалентно включаются в состав лигнина. В таком химически связанном виде они являются относительно инертными и малотоксичными для растения.

Фитоиспарение – это выделение в атмосферу через листья летучих органических веществ, поступивших через корневую систему. Эти вещества испаряются как в неизменном, так и в трансформированном виде.

Ризосферная биоремедиация – это разложение органических загрязняющих веществ в ризосфере растения с участием бактерий и микоризных грибов.

Фитостабилизация – это уменьшение мобильности загрязнений в почве, заключается в таких процессах, как адсорбция или осаждение металлов в виде карбонатов, сульфидов, фосфатов или гидроксидов вблизи или на корнях растений. Чаще всего фитостабилизацию применяют для уменьшения подвижности тяжелых металлов.

Ризофльтрация подразумевает использование растений (наземных и водных) для адсорбции, концентрирования и осаждения загрязнителей в корнях, главным образом в тех случаях, когда концентрация поллютанта низкая.

Перспективной задачей фиторемедиации является получение трансгенных растений, например высокоурожайных гипераккумуляторов металлов, растений с внедренными генами нитрогеназы, деградирующих тринитротолуол и др. (рис. 16).

Преимущества фиторемедиации заключаются в относительно низких затратах, в возможности очистки больших территорий и восстановления ландшафтов, а недостатки – в низких скоростях очистки, чувствительности к ряду факторов (погоде, заболеваниям растений, уходу за растениями), недоступности загрязнений в глубоких слоях почвы, необходимости внесения мелиорантов, структураторов, ирригации. Кроме того, фиторемедиация не может быть эффективна по отношению ко всем без исключения поллютантам, а поглощенные ксенобиотики могут распространяться по пищевым цепям.

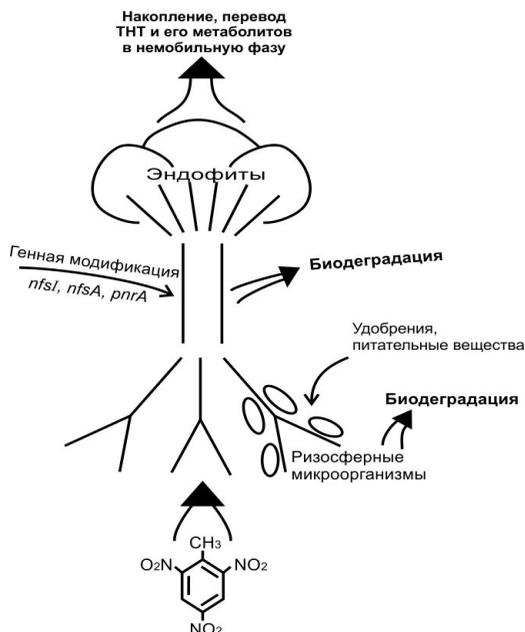


Рис. 16. Схема фиторемедиации загрязненных тринитротолуолом почв [Максимова и др., 2018]

Фиторемедиация используется в тех случаях, когда:

- стоимость очистки имеет большее значение, чем ее продолжительность;
- необходимо предотвратить миграцию загрязнений;
- площади загрязнений значительные;
- ремедиационные работы завершаются (заключительные стадии);
- существует необходимость восстановить ландшафт.

3.3. Утилизация твердых бытовых отходов

Твердые бытовые отходы (ТБО) – гетерогенные смеси, состоящие из веществ и материалов с различными свойствами. ТБО состоят как из стабильных инертных веществ, так и из органических веществ, способных разлагаться с выделением газообразных и водорастворимых соединений, которые формируют эмиссию загрязняющих веществ. Современное обустройство

полигонов должно предусматривать их оборудование в соответствии с экологическими и санитарно-гигиеническими требованиями. Учитывают рельеф местности, особенности геологического строения подстилающих пород, преобладающую розу ветров, особенности окружающего природного ландшафта, возможность образования оползней. Для уменьшения эмиссии просачивающихся газов и дренажных вод полигоны ТБО располагают на возвышенных местах, не затопляемых паводковыми водами, с глубоким залеганием грунтовых вод, вдали от источников водоснабжения. Снятый при подготовке площадки грунт складировается и используется для засыпки отходов. Дно уплотняют, покрывают водонепроницаемым слоем глины, толщиной в несколько метров, полиэтиленовой пленкой, геосинтетической мембраной, обеспечивающими снижение до минимума поступление выщелачиваемых загрязнений в грунтовые воды.

Механобиологическая переработка включает стадии механической и биологической обработки (Рис. 17), направленные на следующие цели:

- максимальное использование ресурсного потенциала отходов;
- производство компоста;
- производство удобрений;
- производство биостабилизированного материала для захоронения;
- производство биогаза;
- производство вторичного топлива.

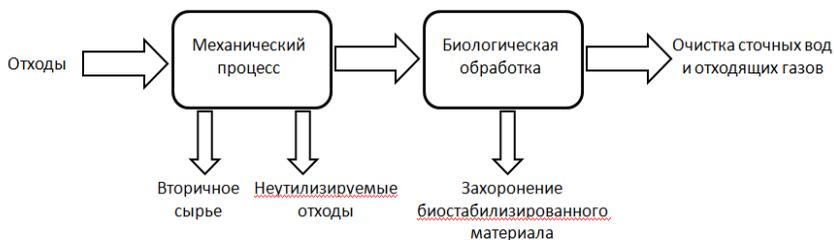


Рис. 17. Механобиологическая переработка отходов
[Управление отходами / под ред. Я.И. Вайсмана, 2012]

Механическая обработка включает:

- магнитную сепарацию,
- аэродинамическую сепарацию,
- ручную сортировку,
- грохочение,
- воздушную классификацию.

Целью механической обработки является выделение вторичного сырья и подготовка отходов к биологической стадии переработки.

Суть процесса биостабилизации отходов заключается в постепенном разложении органической фракции гетеротрофными микроорганизмами в контролируемых условиях. В процессе переработки отходы подвергаются действию повышенных температур, что приводит к гибели большей части патогенных микроорганизмов. Биологическая стабилизация отходов, направляемых на захоронение, разработана для снижения в них биоразлагаемых компонентов до уровня, соответствующего требованиям к захоронению отходов, ее цель – минимизация образования биогаза, снижение ХПК и БПК фильтрата, обеспечение санитарно-эпидемиологической безопасности полигонов.

Биологическая переработка отходов может производиться по одной из следующих технологий:

- полевое компостирование;
- туннельное компостирование;
- компостирование в реакторе;
- анаэробное сбраживание;
- биосушка;
- перколяция.

Компостирование. Сырьем для производства компоста являются органические фракции ТБО, органические отходы сельского хозяйства, пищевой промышленности, торговли пищевыми продуктами, общественного питания. Критериями отнесения отходов к категории сырья для компоста являются следующие показатели:

- содержание органических веществ не менее 45% сухой массы;

- содержание неорганических веществ и загрязняющих компонентов на уровне, не препятствующем технологическим процессам получения компоста.

Для компостирования большое значение имеют химический состав, физические свойства (агрегатное состояние, дисперсность, плотность, влажность) и биологические факторы (представители биоты, населяющие массу отходов). Их подразделяют на группы консументов: первичных, поедающих органические отходы, вторичных, поедающих первичных консументов, и третичных, поедающих вторичных консументов (рис. 18).

По численности, массе и значению среди представителей биоты, участвующей в компостировании, ведущая роль принадлежит микроорганизмам.

При компостировании протекает как аэробный, так и анаэробный процесс. Оба процесса приводят к разложению органической массы ТБО, образованию углекислого газа, биомассы и выделению тепла. При аэробном процессе выделяется на порядок больше тепла, больше выход биомассы, но не образуется метан, а при анаэробном процессе меньше выход биомассы, но образуется энергетически ценный биогаз.



Рис. 18. Пирамида консументов при компостировании органических отходов [Управление отходами / под ред. Я.И. Вайсмана, 2012]

Для всех технологий компостирования на основе микробного разложения должны соблюдаться следующие принципы:

- 1) необходимо наличие определенных видов микроорганизмов, обеспечивающих последовательную деструкцию сложных органических веществ;
- 2) скорость протекания процессов компостирования определяется скоростью метаболических процессов микроорганизмов: технологические решения не могут увеличить скорость деструкции органических веществ, но за счет создания оптимальных условий для жизнедеятельности микроорганизмов можно повысить производительность установок;
- 3) не превышать допустимую нагрузку на определенную популяцию микроорганизмов, так как это приводит к подавлению процесса переработки отходов;
- 4) доля биоразлагаемого органического субстрата в компостируемой смеси должна быть достаточна, а ингибиторы, токсиканты, балластные вещества и другие примеси – либо отсутствовать, либо содержаться в низких концентрациях;
- 5) необходимые для биохимической деятельности микроорганизмов факторы окружающей среды, такие как кислород, влажность, температура, содержание биогенных элементов и микроэлементов, должны быть оптимальны или близки к таковым.

Вермикомпостирование. Сущность процесса вермикомпостирования заключается в использовании природной способности дождевых червей перерабатывать органические отходы. Копролиты (экскременты дождевых червей) состоят в основном из гумусоподобных веществ, содержат активную микрофлору, обширный спектр аминокислот, ферментов, витаминов, биологически-активных веществ. При рытье ходов за сутки червь пропускает через себя количество почвы (отходов), равное его массе. Таким образом, при плотности популяции 500 000 особей на 1 га за 1 сут. они пропускают через себя 0,25 т земли (отходов). Создав для деятельности дождевых червей благоприятные условия и регулярный полив, постоянную температуру, аэрацию, из отходов можно получить биомассу червей, увеличенную в несколько раз, и гумус – субстрат, прошедший через кишечник животного.

Из всего разнообразия дождевых червей для вермикультуры пригодны только несколько видов:

- навозный червь *Eisenia foetida*; подвиды *E. foetida foetid*, *foetida andrel*;
- обыкновенный дождевой червь (или большой красный выползок) *Lumbricus terrestris*;
- малый красный червь (малый выползок) *Lumbricus rubellus*;
- несколько других видов (дендробена *Dendrobaena u др.*).

В 1959 г. в США, в штате Калифорния, был выведен гибрид навозного червя *E. foetida*, получивший название красного калифорнийского червя (*Eisenia foetida red hybrid of California*). Этот червь отличается высокой интенсивностью питания и скоростью утилизации исходных субстратов, быстрым половым созреванием (6–8 недель), высокой плодовитостью – откладывает до 10 коконов в неделю (в год – до 70 коконов с учетом цикла размножения), дает 4–5 поколений в год при высоком коэффициенте размножения (1 : 1500 в течение года) и имеет большую продолжительность жизни (до 15–16 лет). Лишь теплолюбивость калифорнийского червя ограничивает его использование в умеренном и холодном климате.

Получение биогаза

Производство биогаза протекает в анаэробных условиях в процессе сбраживания. В общем виде процесс получения биогаза состоит из следующих этапов:

- подготовка отходов к сбраживанию;
- сбраживание отходов, нацеленное на максимальное извлечение биогаза при минимальных затратах;
- очистка и использование биогаза.

В процессе метаногенеза можно выделить несколько этапов:

1. Биогидролиз полимеров гидролитическими бактериями *Streptococcus*, *Clostridium* и др. с образованием растворимых низкомолекулярных органических соединений (жирных кислот, моносахаридов, аминокислот, пуринов, пиримидинов, спиртов, кетонов).

2. Ацидогенез – образование высших жирных кислот из низкомолекулярных органических соединений ацидогенными бактериями *Acetofilamentum*, *Acetivibrio*, *Acetomicrobium*.

3. Ацетогенез и дегидрогенизация, которые заключаются в образовании водорода, углекислого газа и уксусной кислоты гетероацетогенными водородпродуцирующими бактериями из высших жирных кислот.

4. Метаногенез, осуществляемый метанобразующими археями *Methanotrix*, *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, потребителями водорода и уксусной кислоты.

Сбраживание может быть термофильным (50–55°C) или мезофильным (30–35°C). Термофильные процессы протекают значительно быстрее, обеспечивают максимальную гибель патогенной микрофлоры, но требуют более высоких энергозатрат. Мезофильные процессы чаще всего применяются для сбраживания высокообводненных отходов, термофильные – для сухого сбраживания.

Метантенк представляет собой цилиндрический железобетонный резервуар с коническим днищем и герметическим перекрытием, в верхней части которого имеется колпак для сбора газа, откуда газ отводится для дальнейшего использования. Осадок в метантенке перемешивается и подогревается с помощью особых устройств. Образующийся в метантенках газ состоит в основном из метана – 60–67% и углекислого газа – 30–33%, а содержание водорода не превышает 1–2%. Наибольшая масса газа образуется при распаде жиров, наименьшая – при распаде белков. Жиры и белки в основном разлагаются с высоким выделением метана, а углеводы – с выделением углекислого газа. Для регулирования давления газовой сети и накопления метансодержащего газа устанавливают специальные сооружения – **газгольдеры**.

Получаемый в процессе сбраживания осадок может быть:

- подвергнут биостабилизации и захоронен;
- подвергнут компостированию и использован в качестве компоста;
- обезвожен и использован в качестве удобрения;
- обезвожен и сожжен.

Контрольные вопросы

1. Какие способы очистки сточных вод Вам известны?
2. В чем суть биологической очистки сточных вод?
3. Что такое активный ил? Какие живые организмы в него входят?
4. Перечислите физиологические и экологические группы микроорганизмов активного ила.
5. Что такое иловый индекс? О чем свидетельствуют низкие и высокие значения илового индекса?
6. В чем суть показателей химического и биологического потребления кислорода?
7. Опишите процесс нитрификации и денитрификации.
8. Как осуществляется анаммокс-процесс очистки сточных вод от аммонийного азота? Каковы особенности микроорганизмов, осуществляющих анаммокс-процесс?
9. В чем отличие нитрификации от анаммокс-процесса?
10. Как осуществляется биологическое удаление фосфора в процессе очистки сточных вод?
11. Что такое полифосфаты, какова их роль в клетке?
12. Какие основные проблемы биологической очистки сточных вод Вы знаете? Какие есть пути их решения?
13. Какие два подхода к биологической очистке загрязненных почв Вам известны? Чем следует руководствоваться при выборе метода биологической очистки загрязненных почв?
14. Что такое фиторемедиация? Какие способы фиторемедиации известны?
15. Какие известны технологии, применяемые в биологической переработке твердых бытовых отходов?
16. Каким образом получают биогаз? Какие этапы биологической переработки субстрата выделяют в процессе метаногенеза?

Глава 4. ГЕННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

4.1. Основные принципы генетической инженерии

Генетическая инженерия (ГИ) – совокупность методов и технологий искусственного изменения структуры нуклеиновых кислот, в том числе извлечения ДНК и РНК из биологического материала, манипуляций с генами, считывания и расшифровки генетической информации, получения **рекомбинантных ДНК и РНК**, введения их в другие организмы и др. Включает разделы: **генная инженерия, геномная инженерия.**

Важным направлением генетической инженерии является **генетическое конструирование** клеток-продуцентов, которое включает **методы *in vivo* и *in vitro*.**

Основные технологии, применяемые в конструировании ***in vivo***:

1. Мутагенез и методы отбора мутантов.
2. Применение плазмид и конъюгации у микроорганизмов.
3. Применение бактериофагов и трансдукция.
4. Применение мобильных генетических элементов для мутагенеза и рекомбинации.
5. Генетическая трансформация.
6. Методы работы с протопластами, их трансформация и слияние, введение органелл (у эукариот).
7. Гибридизация эукариотических клеток и организмов.

Основные технологии, применяемые в конструировании ***in vitro***:

1. **Клонирование ДНК.** Осуществляется путем введения фрагментов ДНК или их групп в **векторы** – молекулы-носители, реплицирующиеся генетические элементы на основе плазмид или/и вирусов (бактериофагов), что дает возможность амплифицировать и экспрессировать гены в клетках бактерий или эукариот. Наиболее распространен **рестриктазно-лигазный метод клонирования** с использованием **рестрикции** (расщепление ДНК) и **лигирования** (сшивания); **коннекторный метод** клонирования, основанный на наращивании 3'-концов объединяемых молекул гомополимерными взаимно комплементарными последовательностями (напр., поли-А и поли-Т) и их гибридиза-

ции; методы **ПЦР-клонирования** (объединение с вектором ПЦР-продукта).

2. **Гибридизация нуклеиновых кислот.** Основана на способности нуклеиновых кислот связываться друг с другом по комплементарному принципу, что позволяет выявлять специфические последовательности ДНК и РНК, а также совмещать различные генетические элементы.

3. **Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** – циклический многоциклоый процесс амплификации ДНК *in vitro*, позволяющий из единичных копий небольшой последовательности получить препаративное количество для последующего анализа, клонирования, секвенирования, рекомбинации, мутагенеза и т.д.

4. **Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование).** Позволяет определить структуру генов и аминокислотную последовательность кодируемых ими белков.

5. **Химико-ферментативный синтез полинуклеотидов.** Необходим для целенаправленной модификации генов и облегчения манипуляции с ними.

Эксперименты с **конструированием *in vitro*** функционально активных рекомбинантных ДНК проводят по следующей схеме:

- 1) из организма донора нужных генов экстрагируют нативную ДНК, подвергают ее ферментативному гидролизу (разрезают) и соединяют (лигируют) с другой ДНК (вектором для клонирования) с образованием новой, рекомбинантной молекулы;
- 2) эту конструкцию вводят в клетку-хозяин (реципиент), где она реплицируется и передается потомкам;
- 3) идентифицируют и отбирают трансформированные клетки, несущие рекомбинантную ДНК;
- 4) получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена. Другими способами подтверждения являются ПЦР-анализ (амплификация) искомого фрагмента, гибридизация ДНК.

4.1.1. Ферменты, используемые в генетической инженерии

Рестрикция ДНК осуществляется с помощью специфических ферментов – **рестриктаз**. Это эндонуклеазы, предназначенные для защиты клеток бактерий от чужеродной (вирусной) ДНК. Они способны осуществлять разрывы межнуклеотидных фосфодиэфирных связей внутри полинуклеотидных цепей ДНК. В клетках многих бактерий функционируют системы **рестрикции-модификации** (R-M система), предназначенные для защиты собственной ДНК от фаговой атаки. В систему входит **ДНК-метилаза**, которая метилирует собственную ДНК, в результате чего последняя становится устойчивой к действию рестриктаз. Неметилированная чужеродная ДНК фрагментируется **рестриктазой**. Эта система также препятствует скрещиванию между разными видами и штаммами бактерий и обеспечивает сохранность видов в эволюции. В генетической инженерии рестриктазы используются для фрагментации молекул ДНК при создании рекомбинантных геномов.

Номенклатура рестриктаз была предложена Смитом и Натансом в 1973 г.:

1. Название рестриктазы формируется из родового и видового названий микроорганизма-хозяина, содержащего R-M систему. *Escherichia coli* – *Eco*, *Haemophilus influenzae* – *Hin*.
2. За родовидовым названием приводится название штамма или серотипа.
3. Различные R-M системы, присущие одному виду бактерий, обозначаются римскими цифрами.
4. Если R-M система локализована в геноме плазмиды, то после видо-родового названия указывается символ плазмиды.

Рестриктазы I типа

Содержат 3 неидентичные субъединицы (α , β , γ). Специфичны к неметилированной двуцепочечной ДНК, требуют в качестве кофакторов S-аденоилметионин, АТФ и Mg^{2+} :

α – субъединицы расщепляют ДНК;

β – субъединицы метилируют ДНК;

γ – субъединицы осуществляют узнавание специфических последовательностей ДНК.

Разрывы в цепях ДНК под действием этих рестриктаз происходят случайным образом на значительном расстоянии от участка узнавания, а продукты расщепления оказываются гетерогенными, что затрудняет их использование в генетической инженерии.

Рестриктазы II типа

Состоят из 2 субъединиц 1-го вида, нуждаются только в ионах Mg^{2+} , метилазы этой системы являются самостоятельными ферментами. Рестриктазы II типа узнают в ДНК сайты с палиндромными (чаще тетра- или гексануклеотидными) последовательностями и симметрично разрезают обе нити ДНК. В случае разреза по центру последовательности получаются **тупые** концы. Если фермент делает разрез не по центру палиндрома, то получаются фрагменты ДНК с **липкими** (выступающими) концами, способными комплементарно связываться между собой.

Рестриктазы II типа являются важнейшим инструментом генетической инженерии. Применяются для картирования геномов по различным сайтам рестрикции, выщепления определенных участков, расположенных между этими сайтами (рестриксионные фрагменты), которые далее можно комбинировать.

Открыты ферменты, распознающие непалиндромные структуры и расщепляющие ДНК на строго фиксированном расстоянии от участка узнавания с образованием как «тупых», так и «липких» концов. Из них особенно интересны те, которые образуют достаточно длинные «липкие концы».

Рестриктазы III типа

Сходны с ферментами типа I. Состоят из 2 типов субъединиц (рестриказ и метилаз). Узнают непалиндромные последовательности длиной 5–6 н.п. и расщепляют ДНК в стороне от сайтов узнавания на расстоянии 24–25 н.п.

ДНК-лигаза

Это фермент, способный катализировать синтез фосфодиэфирной связи в 2-цепочечной ДНК. ДНК-лигазы необходимы клетке при осуществлении процессов репарации и репликации ДНК. В генной инженерии используются 2 типа ДНК-лигаз, отличающихся по потребностям в кофакторах и способу действия. ДНК-лигаза *E. coli* в качестве кофактора использует дифосфопиридиннуклеотид, а лигаза фага T4 – АТФ в присут-

ствии Mg^{2+} . Лигаза фага Т4 более универсальна, так как помимо лигирования липких концов способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами.

ДНК-полимераза I

Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 103 кДа и имеет 3-доменную структуру (рис. 19). N - концевой домен соединен с соседним петлей из аминокислотных остатков и легко отделяется с помощью протеолитических ферментов. Оставшаяся часть называется фрагментом Кленова.

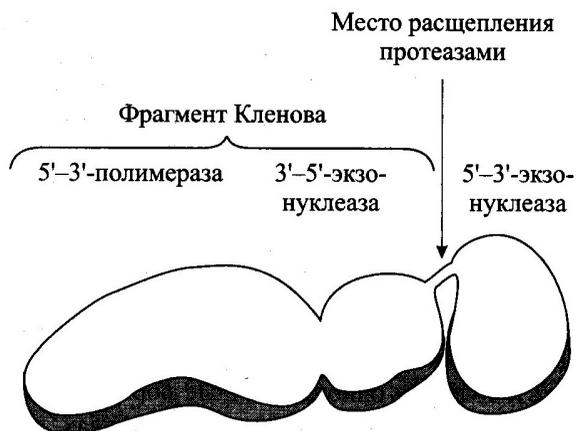


Рис. 19. Структура ДНК-полимеразы I
[URL: http://www.biotechnolog.ru/ge/ge2_3.htm]

Каждый домен обладает своей ферментативной активностью:

- 1) 5'-3'- полимеразной активностью. Для реакции необходимо наличие одноцепочечной ДНК-матрицы и комплементарного участку этой цепи олигонуклеотида – праймера (затравки) с 3'-ОН - концом;
- 2) 3'-5'- экзонуклеазной (корректирующей) активностью. Гидролизует одно- или двухцепочечную ДНК с 3'-ОН-конца;
- 3) 5'-3'- экзонуклеазной активностью. Деградирует одну цепь двухцепочечной ДНК с 5'- конца.

За счет 5'-3' нуклеазной активности ДНК-полимераза I способна отщеплять нуклеотиды с 5'-конца одной цепи ДНК в

спаренных участках, это происходит в месте разрыва – ника. При этом одновременно идут 2 реакции - 5'-3' экзонуклеазный гидролиз и 5'-3' полимеразная реакция. В этом случае происходит процесс переноса 1-цепочечного разрыва вдоль цепи ДНК – ник-трансляция.

РНК-зависимая ДНК-полимераза (ревертаза, обратная транскриптаза)

Осуществляет синтез ДНК на матрице РНК (рис. 20). Обратная транскриптаза состоит из двух субъединиц – α (65 кДа) и β (95 кДа), присутствующих в эквимольном количестве. Обладает, по крайней мере, тремя ферментативными активностями:

- 1) ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;
- 2) активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК – ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК;
- 3) ДНК-эндонуклеазной активностью.

В генетической инженерии ревертаза используется для целенаправленного синтеза на матричных РНК комплементарных молекул ДНК (**кДНК**). С помощью этого фермента можно получить библиотеку транскрибируемых генов. Для этого кДНК включают в плазмиды и клонируют их в клетках бактерий. Такие библиотеки кДНК отличаются от библиотеки геномной ДНК тем, что в последней содержатся клоны, в которых не обязательно присутствуют дискретные гены, т.к. рестриктазы могут разрезать ДНК и внутри генов.

Нуклеаза Bal 31

Фермент Bal 31 обладает экзонуклеазной и эндоуклеазной активностью. Как экзонуклеаза фермент воздействует на оба 3' и 5' конца дуплекса ДНК без образования внутренних разрывов, как высокоспецифичная к однонитевым участкам эндоуклеаза разрезает дуплекс ДНК и РНК в никах, брешах и однонитевых участках. Двунитевые продукты экзонуклеазы являются смесью с тупыми и нетупыми концами.

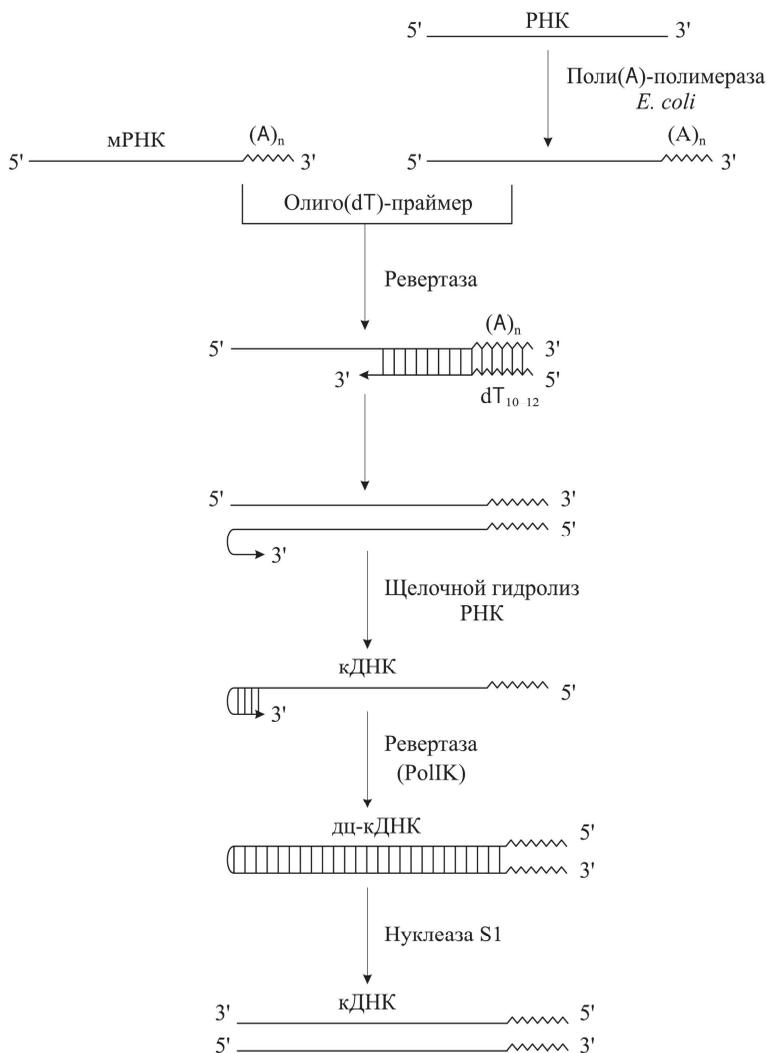


Рис. 20. Схема синтеза кДНК [URL: <https://poznayka.org/s34183t1.html>]

*Терминальная трансфераза (концевая дезоксирибонуклеоти-
дилтрансфераза)*

Этот фермент катализирует последовательное присоеди-
нение дезоксирибонуклеотидов к 3'-ОН – концу (в присутствии

ионов Mg – к выступающему 3'-концу; в присутствии Co – к 3'-ОН ДНК с тупыми концами или даже с выступающим 5'-концом).

Поли(А)-полимераза E. coli

Эта полимеразы катализирует присоединение к 3'-ОН одноцепочечных РНК поли(А)- последовательностей.

4.1.2. Способы получения рекомбинантной ДНК

Гибридные ДНК конструируют двумя методами: *рестриктазно-лигазным* и *коннекторным*. Коннекторный метод являлся первым методом, который в 1972 г. П. Берг с сотрудниками использовал для получения рекомбинантной молекулы ДНК. Этот метод предполагает создание условий для гибридизации продуктов рестрикции разных геномов путем наращивания на их концах комплементарных олигонуклеотидных участков (рис. 21). В процессе создания гибридной ДНК коннекторным методом участвуют 3 фермента: 5'-экзонуклеаза, терминальная нуклеотидилтрансфераза и ДНК-лигаза. К 3'-концам одного из фрагментов ДНК с помощью терминальной трансферазы достраивают одноцепочечные сегменты определенной длины, состоящие из адениновых нуклеотидов (олиго(dA)-сегменты), а к концам другого фрагмента – комплементарные им олиго(dT)-сегменты, состоящие из тиминового оснований. При смешении полученных фрагментов формируются кольцевые структуры за счет водородных связей между олиго(dA)- и олиго(dT)-последовательностями. Одноцепочечные бреши гибридных молекул ДНК застраивают с помощью ДНК-полимеразы и цепи ковалентно сшивают лигазой.

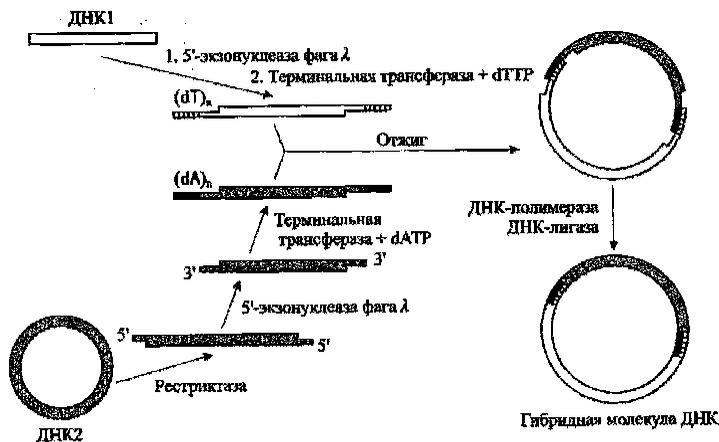


Рис. 21. Коннекторный метод создания гибридных ДНК
 [URL: <http://www.biotheory.ru/bios-881-1.html>]

Рестриктазно-лигазный метод был разработан С. Коэном с сотрудниками в 1973 г. Этот метод проще, чем коннекторный, он позволяет осуществить гибридизацию между фрагментами хромосомной ДНК и ДНК-плазмидой с использованием рестриктазы II без дополнительной процедуры наращивания комплементарных концов. После окончания гибридизации фрагменты сшиваются ДНК-лигазой (рис. 22).

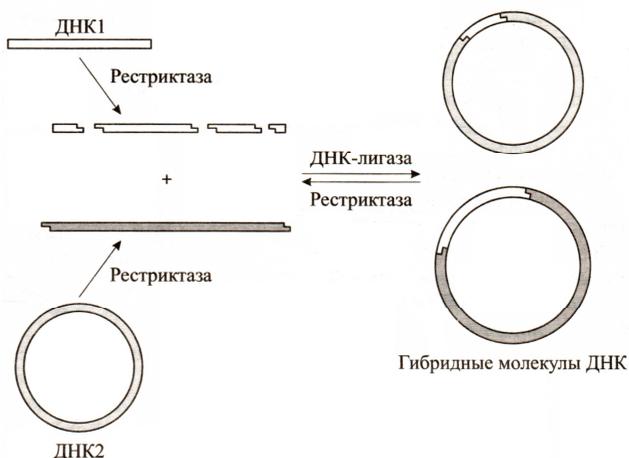


Рис. 22. Рестриктазно-лигазный метод создания гибридных ДНК
 [URL: <http://www.biotheory.ru/bios-881-1.html>]

4.1.3. Клонирование и отбор клонов

Клонирование ДНК – это многократное копирование фрагментов ДНК. В классической методике клонирования ДНК используется способность клеток бактерий поглощать и реплицировать плазмиды. Фрагменты ДНК любого вида, полученные с помощью рестриктаз, можно ввести в плазмиду или бактериофаг, получив вектор молекулярного клонирования, а затем размножить эти генетические элементы в клетках бактерий или дрожжей. **Вектор** – это молекула ДНК, которая способна переносить в клетку чужеродную ДНК и обеспечить там ее амплификацию. Перенос ДНК от одних клеток бактерий в другие основан на трех процессах передачи генетической информации:

- трансформации,
- конъюгации,
- трансдукции.

Трансформация – это процесс поглощения ДНК клетками бактерий из внешней среды. Не все бактериальные клетки способны поглощать ДНК, в противном случае не сохранялась бы генетическая индивидуальность, и понятие вида в мире прокариотов было бы поставлено под сомнение. Способность бактериальных клеток поглощать экзогенную ДНК с последующим изменением генома называется **генетической компетентностью**. Природная компетентность может быть индуцибельной или конститутивной.

Процесс трансформации протекает в 3 стадии: 1) ДНК адсорбируется на клеточной стенке; 2) ДНК проникает внутрь клетки; 3) экзогенная ДНК рекомбинирует с клеточной хромосомной ДНК. ДНК может проникать в клетку только в 1-цепочечной форме, устойчивой к действию нуклеаз.

Конъюгация – однонаправленный перенос генетического материала от донора к реципиенту при непосредственном контакте клеток. Для устойчивого наследования необходимо ее включение в хромосому путем рекомбинации. Реципиент – это любая клетка, способная принимать ДНК от бактерии-донора посредством горизонтального переноса, донор – бактерия, содержащая конъюгативную плазмиду или конъюгативный транспозон и способная передавать ДНК реципиенту путем горизон-

тального переноса генов. Конъюгативная плаزمида – это плазмида, способная к самостоятельному переносу, содержащая гены *tra*, белковые продукты которых обеспечивают образование межклеточного контакта и перенос ДНК в клетку-реципиент.

Трансдукция – механизм обмена генетическим материалом между бактериями с участием бактериофагов. Специфическая трансдукция – перенос ограниченного числа генов клетки-хозяина, расположенных в участке включения ДНК фага в хромосому бактерии. Неспецифическая (общая) трансдукция – перенос разнообразных генов хозяина, расположенных в различных участках генома бактерии.Abortивная трансдукция – перенос генов без включения в геном. Перенесенная ДНК при этом транскрибируется, но не реплицируется.

Отбор клонов можно проводить по какому-либо признаку, который позволяет отличить колонии (организмы), получившие чужеродную ДНК, от организма с неизменным геномом. Таким признаком у бактерий может быть устойчивость к антибиотикам, синтез фермента, способствующего образованию окрашенного продукта и т.д.

Для клонирования ранее использовался вектор pBR322 – плазмида длиной 4362 н.п. В норме в клетке может содержаться до 50 копий этой плазмиды. В ее составе имеются гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину. Следовательно, клетки, содержащие данную плазмиду, могут быть выращены на среде с ампициллином или тетрациклином. Очищенную кольцевую плазмиду pBR322 обрабатывают рестриктазой, расщепляющей ее в единственном сайте, расположенном в одном из генов устойчивости к тому или другому антибиотику, в результате образуется линейная молекула с липкими концами. Ее смешивают с донорной ДНК, содержащей нужный ген и предварительно обработанной такой же рестриктазой. За счет взаимно комплементарных липких концов происходит спаривание ДНК с образованием гибридных молекул. Смесь обрабатывают ДНК-лигазой фага T4 в присутствии АТФ. Плазмидную ДНК предварительно обрабатывают щелочной дефосфатазой, которая отщепляет от линейаризованной молекулы 5'-фосфатные группы, в результате ДНК-лигаза не может сшить концы дефосфорированной линейной плазмидной ДНК. Затем вектор вводят в клет-

ку хозяина путем трансформации. Для того чтобы рекомбинантная ДНК сохранилась, в клетке хозяина необходимо отсутствие генов, кодирующих синтез рестриктаз, которые могут привести к ее деградации. Также необходимо, чтобы клетка была способна к общей рекомбинации. Чтобы идентифицировать клетки, получившие рекомбинантные ДНК, после трансформации их высевают на среду, содержащую ампициллин. В результате вырастают клетки, содержащие интактный ген Amp^r в составе интактной или гибридной плазмиды. Клетки, несущие гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину, т.к. встраивание фрагмента ДНК происходит в гене устойчивости к тетрациклину Tet^r . Поэтому далее клетки, выросшие на ампициллине, методом перепечатки переносят на среду с тетрациклином. Не выросшие на среде с тетрациклином клетки содержат гибридную плазмиду.

В настоящее время используют альтернативные системы клонирования. Плазида рUC19 длиной 2686 п.н. содержит ген устойчивости к ампициллину, сегмент гена β -галактозидазы ($lacZ'$) лактозного оперона *E. coli*, ген *lacI*, кодирующий репрессор, который контролирует экспрессию гена $lacZ'$, и полилинкер – короткую последовательность с множеством уникальных сайтов рестрикции, а также точку начала репликации (рис. 23).

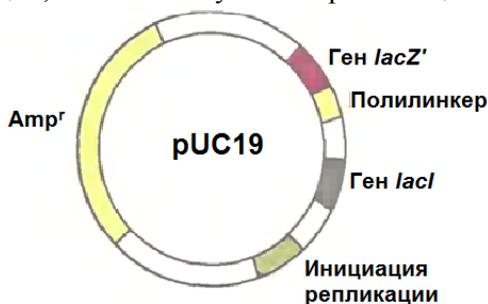


Рис. 23. Плазида рUC19

В клетках с интактной плазмидой в присутствии индуктора транскрибируется ген $lacZ'$, синтезируется активная β -галактозидаза, которая расщепляет хромогенный субстрат, в результате чего колонии окрашиваются в синий цвет. Клетки, несущие рекомбинантную плазмиду, образуют на той же самой

среде белые колонии. Это связано с тем, что обычно при встраивании в полилинкер чужеродной ДНК не может образовываться полноценный продукт гена *lacZ'* и не образуется активная β -галактозидаза.

Поиск клонов, несущих искомую последовательность ДНК. Чтобы обнаружить клоны с нужным встроенным геном, используют:

- ПЦР-анализ;
- гибридизацию с меченным ДНК-зондом с последующим радиоавтографическим анализом;
- иммунологический скрининг;
- скрининг по активности белка, кодируемого геном-мишенью.

Клонирование генов эукариотов. Прокариоты не способны удалять интроны из первичных РНК-транскриптов, поэтому правильная трансляция эукариотических мРНК в бактериальной клетке невозможна. В связи с этим нельзя встраивать ДНК эукариотов напрямую в ДНК прокариотов. Также в ДНК-вектор нельзя встраивать мРНК, поэтому сначала на ней необходимо синтезировать 2-цепочечную ДНК. Для этого последовательно используют 2 разные полимеразы – обратную транскриптазу и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I.

Для клонирования генов эукариотов в ДНК необходима следующая последовательность действий:

1. Синтезируют ДНК *in vitro* с помощью обратной транскриптазы. Синтез идет не до конца, при этом обратная транскриптаза обычно «поворачивает вспять» и присоединяет несколько нуклеотидов в обратном направлении, в результате чего образуется «шпилька».
2. Добавляют фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, который достраивает вторую цепь ДНК. По окончании синтеза препарат обрабатывают РНКазой H и нуклеазой S1.
3. Разные кДНК встраивают в плазмидный вектор и получают библиотеку кДНК.
4. Проводят скрининг кДНК-библиотеки.

Библиотека кДНК отличается от библиотеки геномной ДНК, которую получают после обработки ДНК рестриктазами.

В библиотеке геномной ДНК содержатся миллионы клонов – колоний, в которых не обязательно присутствуют дискретные гены, т.к. рестриктазы разрезают ДНК и внутри генов. В то же время обратная транскриптаза дает возможность получить библиотеку транскрибируемых генов.

4.1.4. Технологии редактирования геномов высших организмов: CRISPR/Cas 9 и TALEN

CRISPR/Cas 9 – новая технология редактирования геномов высших организмов, базирующаяся на иммунной системе бактерий. Эта система основывается на особых участках бактериальной ДНК, которые представляют собой короткие палиндромные кластерные повторы, или **CRISPR** (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Между идентичными повторами располагаются отличающиеся друг от друга фрагменты ДНК – спейсеры, многие из которых соответствуют участкам геномов вирусов, паразитирующих на данной бактерии. При попадании вируса в бактериальную клетку он обнаруживается с помощью специализированных **Cas-белков**. "Cas" расшифровывается как *CRISPR-associated sequence*, т.е. последовательность, ассоциированная с CRISPR. Эти белки связаны с РНК, которая считывается с последовательностей CRISPR. Если фрагмент вируса «записан» в спейсере CRISPR-РНК, Cas-белки разрезают вирусную ДНК и уничтожают ее, защищая клетку от инфекции.

Этот процесс состоит из нескольких стадий. На первой стадии, называемой адаптацией, микроорганизм встраивает в соответствующий CRISPR-локус своего генома небольшой фрагмент проникшей в бактериальную клетку чужеродной ДНК бактериофага, формируя новый спейсер и располагая его определенным образом (впереди остальных, встроенных ранее аналогичных последовательностей). На второй стадии, стадии транскрипции, происходит синтез РНК на матрице ДНК всего CRISPR локуса, сопровождаемый процессингом, в результате которого образуются короткие РНК (**крРНК**), связывающиеся с обладающей шпильчатой вторичной структурой транскодируемой РНК (**тракрРНК**). На третьей стадии, названной интерференцией, формируется комплекс из этих крРНК и тра-

крРНК с Cas нуклеазой, где спейсер (вариабельный участок молекулы крРНК) связывается с фрагментом чужеродной ДНК – «протоспейсером», а фермент Cas его разрушает (рис. 24).

Общая стратегия геномной инженерии эукариотических организмов с помощью сайт-специфических нуклеаз включает четыре основных этапа:

- выбор целевой нуклеотидной последовательности в геноме;
- создание нуклеазной конструкции, направленной на выбранную мишень;
- доставка этой конструкции в клеточное ядро;
- анализ полученных мутаций.

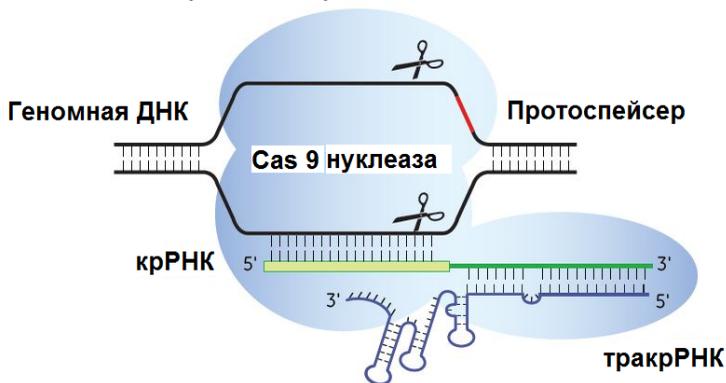


Рис. 24. Cas 9 нуклеаза, направляемая комплексом тракрРНК/крРНК
[URL: <https://dharmacon.horizondiscovery.com/applications/gene-editing/>]

Одним из основных недостатков системы CRISPR/Cas9 является сравнительно высокая вероятность возникновения нецелевых мутаций.

Ранее, до создания этой системы редактирования геномов, был разработан метод на основе эффекторных белков TALE. История разработки этой системы связана с изучением бактерий рода *Xanthomonas*. Эти патогены культурных растений секретируют в цитоплазму растительных клеток эффекторные белки (*Transcription Activator-Like Effectors*, TALE), которые увеличивают восприимчивость растительной клетки к данному организму. При дальнейшем изучении механизмов действия эф-

факторных белков было обнаружено, что они способны связываться с ДНК и активировать экспрессию своих генов-мишеней, имитируя факторы транскрипции эукариот. Были получены генетические конструкции, экспрессирующие искусственные химерные нуклеазы, которые содержат ДНК-связывающий домен и каталитический домен эндонуклеазы рестрикции FokI. Данная система позволяет создать искусственные нуклеазы, мишенью которых будет любая нуклеотидная последовательность. Метод редактирования геномов получил название **TALEN** (аббревиатура от англ. *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*).

Таблица 3
Основные события в истории создания технологии CRISPR/Cas9

Год	Научный результат/событие	Страны
1987	Первое упоминание в литературе об обнаружении необычных tandemных повторов (ставших позже известными как CRISPR) у грамотрицательных бактерий	Япония
2007	Первое экспериментальное доказательство того, что системы CRISPR/Cas способны обеспечить бактериям защиту от бактериофагов. Показана ключевая роль Cas-белка в этом процессе. Выдвинуто предположение, что Cas-белок является нуклеазой	США Франция Канада
2012	Серьезное улучшение технологии CRISPR/Cas9 редактирования геномов за счет объединения тракрРНК и крРНК в единую направляющую РНК (sgRNA)	США Австрия Швеция
2013	Показана возможность CRISPR/Cas9 редактирования эукариотических организмов	США КНР

Технология CRISPR/Cas9 разрабатывается многими исследовательскими группами, поэтому, в отличие от открытия структуры ДНК, не имеет авторства. Можно назвать имена пятирех ученых, наиболее отличившихся при изучении CRISPR/Cas9 и создавших на ее основе передовую технологию редактирования генов и геномов про- и эукариотических организмов. Это Эммануэль Шарпентье (E. Charpentier) из Института инфекционной биологии Макса Планка (Германия), Дженнифер Дудна (J. Doudna) из Калифорнийского университета в Беркли (США), Лучиано Марраффини (L. Marraffini) из Рокфеллеровского университета (США), Франциско Моджика (F.J.M. Mojica) из Университета Аликанте (Испания), Фэн Чжан (F. Zhang) из Гарвардского университета и Массачусетского технологического института (США). Основные события в создании этой системы редактирования геномов относятся к последним десятилетиям (табл. 3).

В 2011 г. журнал «Nature Methods» назвал технологию геномного редактирования TALEN методом года, а в 2015 г. «прорывом года» стала технология CRISPR/Cas9.

Доставка конструкций, экспрессирующих компоненты системы CRISPR/Cas9 в клетки, может быть выполнена следующим образом:

1. Для трансформации клеточных культур человека, мыши и других организмов чаще используют плазмиды, обеспечивающие активную продукцию нуклеазы Cas9 и sgRNA (гидовой РНК) *in vitro*.
2. В случае трансформации целого организма разработан метод, основанный на микроинъекции мРНК Cas9 и гидовой РНК в одноклеточные эмбрионы. Этот метод активно применяют у мышей, полосатого данио (*Danio rerio*) и дрозофилы.
3. Для широкомасштабного, охватывающего геном нокаута с использованием больших библиотек гидовой РНК, используют лентивирусные векторы.
4. У растений, клетки которых имеют плотную клеточную стенку, широко применяется метод плазмидной трансформации протопласта в клеточных культурах, а также агробактериальная трансформация при помощи бактерии *Agrobacterium tumefaciens*.

Применение систем CRISPR/Cas9 и TALEN

Системы CRISPR/Cas9 и TALEN применяют для создания мутаций в генах высших организмов (рис. 25).

Нуклеаза делает в сайте-мишени двухцепочечные разрывы, которые репарируются в клетке по следующим механизмам:

- с помощью негомологичного соединения концов, при котором возникают ошибки, что приводит к появлению в целевом локусе мутаций по типу инсерций и делеций;
- с помощью гомологичной рекомбинации, при которой неповрежденный гомолог служит матрицей для восстановления исходной структуры ДНК; это событие происходит в клетке довольно редко, но использование CRISPR/Cas9 и TALENs позволяет повысить вероятность прохождения гомологичной рекомбинации на несколько порядков.
- с помощью репарации, называемой HDR (homology-directed repair), которая заключается в добавлении к компонентам CRISPR/Cas9 искусственно синтезированной молекулы ДНК, имеющей гомологию с последовательностью нуклеотидов в месте разрыва. При этом небольшой фрагмент искусственной матрицы встраивается в целевой локус. В качестве такой матрицы чаще всего используют два типа конструкций: одноцепочечные олигонуклеотиды или плазмидные векторы.

Таким образом, с помощью сайт-специфических нуклеаз можно получить следующие мутации:

1. Делеции или инсерции нескольких нуклеотидов сайта-мишени, опосредованные негомологичным соединением концов в отсутствие донорной плазмиды. Одним из результатов такого процесса является генный нокаут из-за сдвига рамки считывания и образования стоп-кодонов.
2. В присутствии двухцепочечных олигонуклеотидов или донорной плазмиды фрагменты ДНК, длиной свыше 14 т.п.н., могут встраиваться посредством лигирования, опосредованного негомологичным сшиванием концов.
3. Одновременное внесение нескольких двухцепочечных разрывов может приводить к делециям, инверсиям или

транслокациям участков ДНК, расположенных между этими разрывами.

4. Гомологичная рекомбинация в присутствии донорной плазмиды с плечами гомологии, фланкирующими встраиваемый фрагмент, или линейной донорной последовательности с гомологией менее 50 п.н. приводит к внедрению одного или нескольких трансгенов для коррекции или замены существующих генов.

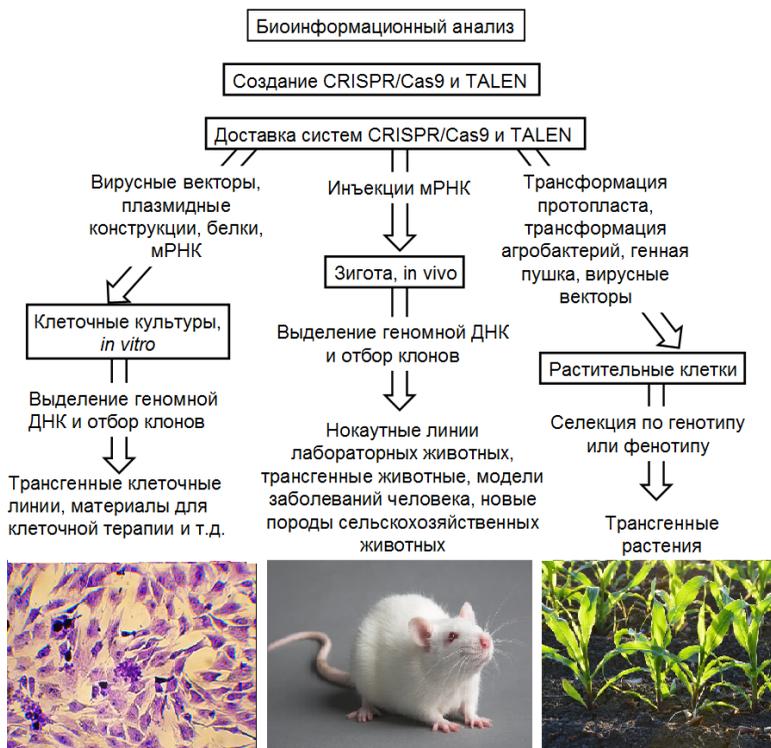


Рис. 25. Применение систем CRISPR/Cas9 и TALEN для редактирования геномов высших организмов

Можно привести некоторые примеры использования системы CRISPR/Cas9 для редактирования геномов растений. Например, если с помощью CRISPR/Cas9 системы у хлопчатника вызвать нокаут гена аргиназы, то боковые корни начинают

расти много лучше, что может позволить успешно выращивать такие растения на различных почвах. Недавно сообщалось о создании нового сорта томатов, названного Tomelo, в котором произведен нокаут гена *SlMlo1*, обеспечивающего поражение мучнистой росой натурального растения. У красного шалфея *Salvia miltiorrhiza* произведен нокаут гена дитерпенсинтазы, задействованной в биосинтезе вторичного метаболита таншинона, который может быть использован как кардиопротекторное средство. При редактировании генома одуванчика кок-сагыза *Taraxacum kok-saghyz* было произведено нокаутирование гена, вовлеченного в биосинтез инулина, который является антагонистом наработки каучука. Доставка компонентов CRISPR/Cas9 в клетку осуществлялась с помощью агробактерии, вызывающей образование косматых корней, что являлось также фенотипическим маркером образцов, в которых должно было произойти редактирование.

4.2. Клеточная инженерия

Клеточная инженерия – это совокупность методов, используемых для конструирования новых клеток, в частности, их гибридизация, манипуляции по пересадке клеточных ядер, реконструкции жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов, клонирование и культивирование клеток на специальных средах. Объектом исследования клеточной инженерии является культура клеток и тканей. Клеточная инженерия широко применяется в медицинской биотехнологии, растениеводстве и животноводстве.

Гибриды между опухолевыми клетками и лимфоцитами (гибридомы) используются для получения моноклональных антител, применяемых в лечебных и диагностических целях. Гибридомы обладают свойствами обеих клеточных линий: как раковые клетки они способны неограниченно долго делиться на искусственных питательных средах, и подобно лимфоцитам, вырабатывают моноклональные антитела определенной специфичности.

Среди методов клеточной инженерии следует особо отметить метод слияния протопластов, используемый в растение-

водстве. **Слияние протопластов** является методом соматической (парасексуальной) гибридизации. В отличие от обычной, где сливаются половые клетки (гаметы), при парасексуальной гибридизации в качестве родительских используются диплоидные клетки растений.

- Техника парасексуальной гибридизации позволяет:
- скрестить филогенетически отдаленные виды растений (организмов);
- получить асимметричные гибриды, несущие генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами, органеллами или цитоплазмой другого;
- получить слияние трех и более клеток;
- получить гибриды, представляющие сумму генотипов родителей;
- перевести мутации в гетерозиготное состояние, что позволит получить жизнеспособные формы при слиянии протопластов;
- получить растения, гетерозиготные по внеядерным генам.

Слияние бывает спонтанным (чаще у протопластов из молодых тканей или суспензионных культур) или индуцированным. Для стимуляции слияния протопластов предложен ряд физических и химических методов. При физическом способе слияния протопластов, разработанном в 1981 году Г. Циммерманом с сотрудниками, протопласты помещают в камеру с неоднородным электрополем. На электродах образуются агрегаты из 2-3 протопластов, либо цепочки из 5-6 протопластов между электродами. Дополнительный единичный импульс постоянного тока приводит к образованию пор в плотно сжатых мембранах. Переменный ток некоторое время удерживает протопласты вместе, при этом происходит перетекание цитоплазмы и слияние протопластов. Затухающий ток приводит к возвращению сферической формы у слившихся протопластов.

Чаще для индукции слияния протопластов используют среду с полиэтиленгликолем (ПЭГ), высокие значения pH (9–11) и высокую концентрацию Ca^{2+} (100–300 ммоль/л). При использовании этого химического метода получают до 50% слившихся протопластов. В присутствии ПЭГ наблюдается сильная адгезия

протопластов, а после его удаления и добавления кальция – их слияние. Предполагают, что рН и ионы кальция увеличивают текучесть мембран.

Слияние протопластов приводит либо к образованию **соматического гибрида**, либо цитоплазматического гибрида (**цибрида**). Соматический гибрид – это продукт слияния и цитоплазмы, и ядра обоих протопластов. Цибрид – это растение-регенерант, содержащее цитоплазму обоих родителей и ядро одного из них. Цибриды получают путем облучения перед слиянием одного из протопластов γ -лучами для разрушения ядра.

Контрольные вопросы

1. Что такое генетическая инженерия?
2. Перечислите основные технологии, применяемые для получения генетически модифицированных организмов.
3. Перечислите основные этапы получения рекомбинантных ДНК.
4. Какие ферменты используются в генетической инженерии?
5. Какие существуют способы получения рекомбинантных ДНК?
6. Каким образом клонируют ДНК?
7. Что такое трансформация, конъюгация и трансдукция?
8. Каким образом можно обнаружить клоны, несущие искомую последовательность ДНК?
9. Чем отличается клонирование генов эукариотов от клонирования генов прокариотов?
10. В чем заключаются технологии редактирования геномов высших организмов CRISPR/Cas9 и TALEN?
11. Что такое «иммунная система» бактерий?
12. Каким образом применяют системы CRISPR/Cas9 и TALEN для создания мутаций в генах высших организмов?
13. Что такое клеточная инженерия?
14. В чем заключается метод слияния протопластов?

Глава 5. БИОИНДИКАЦИЯ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ

Мониторинг (от лат. *monitor* – наблюдающий, предупреждающий) – это система контроля, наблюдений, получения характеристик текущего состояния, оценки и прогнозов изменений окружающей среды под влиянием природных и антропогенных факторов.

Как система наблюдения и контроля мониторинг состоит из трех ступеней:

- наблюдение за влиянием техногенных факторов на природные среды и за реакцией биологических систем на эти воздействия;
- оценка состояния окружающей среды, выявление закономерностей и прогноз возможных изменений;
- выявление причин этих изменений и источников антропогенных воздействий.

Важнейшими задачами мониторинга являются:

1. Оценка пределов допустимой нагрузки на экосистемы; предупреждение об угрозе здоровью человека, о стихийных бедствиях и экологических нарушениях;

2. Предоставление достоверной и оперативной информации, на основании которой принимаются практические решения по улучшению качества окружающей среды, состояния животного и растительного мира, здоровья человека, разработке мероприятий по нейтрализации последствий антропогенного воздействия и выбору природоохранных технологий.

Имеются различные классификации системы мониторинга. В зависимости от масштабов воздействия выделяют три уровня мониторинга:

- биосферный,
- экологический,
- локальный.

На биосферном уровне объектом наблюдения является биосфера в целом, такие параметры, как радиационный фон, концентрация озона и углекислого газа, циркуляция тепловых потоков, изменения климата и т.д. Объектами экологического мониторинга являются экосистемы, на уровне которых прослеживаются изменения их структуры и функций, продуктивности, состояние земельных, водных и растительных ресурсов. Целью

локального, или санитарно-гигиенического мониторинга, является определение количественных характеристик загрязнителей в среде и сопоставление их с санитарно-гигиеническими нормативами.

В зависимости от компонентов окружающей среды выделяют:

- геофизический,
- климатический,
- химический,
- биологический мониторинг.

По способу исследований мониторинг может быть активный или пассивный, по объектам наблюдения – геоботанический, альгологический, зоологический, микробиологический и т.д.

Мониторинг состояния окружающей среды можно проводить с помощью биологических объектов, и в этом случае говорят о биотестировании и биоиндикации.

Биотестирование – это метод исследования, при котором о качестве окружающей среды судят по выживаемости и / или продуктивности помещенных в эту среду организмов (тест-объектов), по их физиолого-биохимическим или поведенческим показателям.

Различают:

- острые биотесты длительностью от нескольких минут до 24–96 ч., в которых рассчитываются показатели выживаемости;
- краткосрочные хронические тесты длительностью 7 сут., заканчивающиеся после получения первого поколения тест-объектов;
- хронические тесты, в которых измеряются характеристики тест-объектов, охватывающие несколько поколений (нарушение жизненных функций организмов, плодовитости, возникновение патологических состояний, мутаций, сокращение продолжительности жизни).

Эколого-токсикологические исследования, основанные на определенной системе биологического тестирования, проводятся для решения таких задач, как:

- установление концентрации исследуемого фактора, при которой в острых опытах продолжительностью 24–72 ч. отмечается достоверная гибель специально подобранных тест-культур. При этом рассчитывается показатель ЛД50, отражающий концентрацию исследуемого вещества, приводящей к 50%-ной гибели тестируемых живых организмов;
- установление концентрации исследуемого вещества, при которой в хроническом эксперименте на тест-культурах с коротким жизненным циклом наблюдается выраженный эффект подавления репродукции организмов в ряду поколений;
- выявление существенных нарушений поведения организмов при действии испытываемых веществ, мешающих осуществлению их основных биологических функций, таких как питание и размножение.

Наиболее распространенными тест-объектами являются микроорганизмы (энтеробактерии, сальмонеллы, псевдомонады, дрожжи), вирусы, водоросли, простейшие, клеточные культуры и ранние зародыши экспериментальных животных, растения, насекомые, кольчатые черви, позвоночные животные, гнотобиотические (искусственно полученные стерильные, не имеющие микрофлоры) организмы. Часто используются для целей биотестирования кресс-салат, зеленые и диатомовые водоросли, хлорелла обыкновенная, инфузория-туфелька, дафнии, гуппи. В разных странах для целей биотестирования могут быть использованы различные растения, так, в США это кукуруза, огурец, сахарная свекла, в Великобритании – горох, чечевица, сахарная свекла, в Австралии – пшеница, в Италии – капуста, фасоль, огурец, просо, в России – редис, мак, пшеница, салат, горчица, кукуруза.

Биоиндикация – это индикация абиотических и биотических факторов биогеоценоза с помощью биологических систем.

Биотестирование и биоиндикация могут проводиться на разных уровнях организации живых организмов: на молекулярном, клеточном, организменном, популяционном и биоценотическом. При пассивной биоиндикации у свободно живущих ор-

организмов исследуются видимые изменения или отклонения от нормы, являющиеся признаками стрессового воздействия, а при активной анализируют воздействия на тест-организмы, находящиеся в стандартных условиях на исследуемой территории. При прямой биоиндикации фактор среды действует непосредственно на биологический элемент, при косвенной – наблюдаемые изменения у биоиндикатора происходят под влиянием других элементов. Чувствительные биоиндикаторы реагируют на воздействие значительным отклонением от нормы, аккумулятивные – накапливают изменения постепенно.

5.1. Использование прокариотов в биоиндикации и биомониторинге

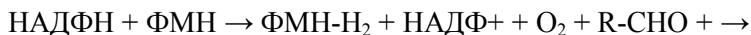
Биосенсоры. Большая часть биосенсорных технологий основывается на использовании так называемых репортерных белков, содержание которых в клетке может быть количественно измерено по флуоресцентному или люминесцентному сигналу, а также колориметрически при изменении окраски. Такая биоиндикация основана на активации синтеза этих белков путем экспрессии соответствующего гена в результате контакта бактериальной клетки с анализируемым соединением. Это становится возможным при использовании генных слияний: искусственных генетических конструкций, в которых беспромоторный ген-репортер объединен с промоторной областью гена, экспрессия которого возрастает в ответ на поллютант. Таким образом, синтез репортерного белка запускается в результате активации промотора в ответ на присутствие анализируемого соединения.

Широкое распространение в качестве репортера получил зеленый флуоресцентный белок (GFP) из медузы *Aequorea victoria*. Он дает высокий квантовый выход, нетоксичен для клеток, не нуждается в присутствии субстратов, кофакторов, АТФ и функционально стабилен в течение 48 ч. В качестве белков-репортеров в цельноклеточных биосенсорах часто используются также бактериальные и эукариотические люциферазы. Может быть использован фермент, например, β -галактозидаза *Escherichia coli*, кодируемая геном *lacZ*. Этот фермент способен разлагать специфические синтетические субстраты с образованием окрашенных продуктов, концентрация которых определя-

ется колориметрически. В настоящее время созданы биосенсоры к различным органическим растворителям, пестицидам, фенолам, полиароматическим углеводородам, полихлорированным бифенилам, тяжелым металлам, алифатическим углеводородам, взрывчатым веществам.

Стратегия люминесцентного биомониторинга основывается на определении общей токсичности образца по уровню тушения свечения биосенсора на природных штаммах фотобактерий и специфической генотоксичности по активации свечения мутантов или генно-инженерных штаммов, обладающих встроенным комплексом сенсорных и люминесцентных генов. Интенсивность свечения природного или генно-инженерного объекта служит количественным индикатором общей или специфичной токсичности образца. Уровень свечения для большинства токсинов хорошо коррелирует с результатами стандартных биотестов на рыбах, ракообразных и простейших. В качестве светоизлучающих прокариотов могут быть использованы бактерии *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio harveyi*, *V. fischeri* и их мутанты, а также рекомбинантные штаммы многих видов бактерий (чаще – *E. coli*) с клонированными генами люциферазы.

Биолюминесцентная система фотобактерий представлена трехсубстратной ферментативной реакцией, катализируемой ферментом люциферазой и сопряженной с ней НАДН / НАДФН / ФМН – оксидоредуктазой. Под действием оксидоредуктазы НАДН (НАДФН) осуществляет восстановление связанного с люциферазой ФМН, который, в свою очередь, окисляется кислородом с образованием пероксида флавиномононуклеотида и стабильного комплекса с альдегидом. После окисления субстратов комплекс медленно распадается, высвобождая продукты. Люцифераза, чаще всего локализованная в цитоплазматической мембране, является монооксигеназой и осуществляет внедрение одного атома кислорода в молекулу альдегида, гидроксيليруя его до соответствующей карбоновой кислоты. Сочетание альдегида и восстановленного рибофлавин-фосфата представляет собой люциферин фотобактерий. В результате реакции образуются ФМН, карбоновая кислота и квант света. Свечение происходит в видимой области спектра, соответствующей длинам волн от 475 до 540 нм (чаще 490 нм). В общем виде схемы реакции выглядят следующим образом:



Возможны несколько механизмов воздействия экотоксикантов на клетки фотобактерий, что выражается в снижении интенсивности их биолюминесценции:

- ингибирование бактериальной люциферазы или сопряженных ферментативных систем;
- разрушение клеточной мембраны, где локализована бактериальная люцифераза;
- ингибирование дыхательной цепи и снижение пула восстановленных эквивалентов (НАДФН, НФДН).

Иначе говоря, свечение зависит от физиологического состояния бактериальной клетки, поэтому уровень снижения люминесценции будет свидетельствовать о токсичности испытуемого вещества.

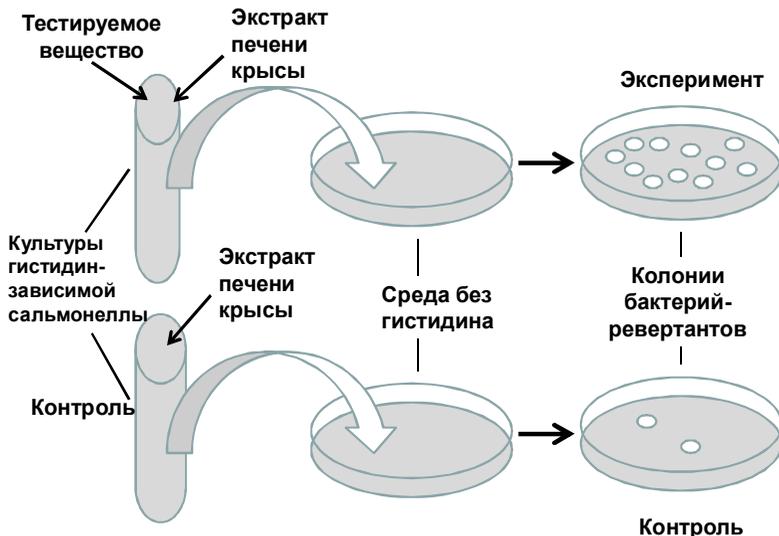


Рис. 26. Тест Эймса

Тест Эймса. Эта методика была описана в ряде работ в начале 1970-х гг. Брюсом Эймсом и его группой (Калифорнийский Университет, г. Беркли). Смысл этого теста заключается в определении частоты реверсии мутаций, вызванных воздействием испытуемых соединений. В тесте используются некоторые штаммы бактерии *Salmonella typhimurium*, которые несут мутации в генах, участвующих в синтезе гистидина – ауксотрофные мутанты, требующие искусственного внесения гистидина для роста. В тесте изучается возможность предполагаемого мутагена вызывать реверсивную мутацию данного гена, при которой штамм приобретает способность расти на среде, не содержащей гистидин (рис. 26).

Контрольные вопросы

1. Каким образом можно классифицировать систему мониторинга окружающей среды?
2. Что подразумевается под термином «биотестирование»? Какие биотесты различают?
3. Как прокариоты могут использоваться в биоиндикации и биомониторинге?
4. Что такое репортерные белки? Приведите примеры репортерных белков.
5. Что представляют собой генные слияния?
6. Из чего состоит биолюминесцентная система фотобактерий?
7. Каковы механизмы воздействия экотоксикантов на клетки фотобактерий?
8. Что представляет собой тест Эймса?

Глава 6. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

6.1. Метагеномика

Термин **метагеномика**, впервые введенный Хэндельсманом в 1998 г., означает исследование смешанных микробных популяций на уровне ДНК непосредственно в среде обитания. ДНК извлекается из природной среды (почв, воды, осадков, растительных и животных организмов и т.д.) и клонируется в векторы для создания больших библиотек клонов. Теоретически, метагеномная библиотека содержит клоны, представляющие генетическую информацию всех микроорганизмов одной среды обитания, тогда как на практике ее полнота зависит от эффективности методов выделения и клонирования ДНК. Информация, хранящаяся в метагеномной библиотеке, может использоваться для определения филогенетического разнообразия сообществ (рис. 27), поиска определенных микроорганизмов, обладающих известной, полезной для биотехнологий ферментативной активностью, путей биосинтеза, отдельных генов.

Способность прокариотов адаптироваться к самым различным средам обитания, в том числе экстремальным, от гидротермальных источников на дне океана до кислых шахтных вод, связана с их метаболическим и физиологическим разнообразием. Метагеномный подход дает возможность не только проанализировать филогенетическое разнообразие биопленок из окружающей среды, но и обнаружить опероны и отдельные гены, кодирующие белки, которые представляют биотехнологический интерес.

Метагеномика способствовала обнаружению широкого диапазона биокатализаторов. На основе информации о природном разнообразии ферментов и влияющих на их функции факторов, стала возможной оптимизация биокатализаторов для различных процессов. Одним из основных подходов к поиску новых биокатализаторов является функциональный скрининг, для которого необходимо осуществление экспрессии генов в гетерологичном организме, обычно в *Escherichia coli*. Диапазон гетерологичных хозяев для экспрессии генов из метагеномных биб-

лиотек был дополнен видами *Streptomyces lividans* и *Pseudomonas putida*. Например, для того чтобы провести скрининг путей биосинтеза, содержащих поликетидсинтазу I типа, вовлеченную в продукцию таких антибиотиков, как эритромицин, рапамицин, эпотилон, в качестве гетерологичных хозяев использовали *E. coli* и *S. lividans*, что позволило обнаружить 8 позитивных клонов из 5000, входящих в метагеномную библиотеку. В целом, изучение почвенных метагеномных библиотек актуально для обнаружения новых биосинтетических путей с целью получения продуктов, представляющих терапевтический интерес.

Почва всегда считалась одним из основных источников антибиотиков, хотя в последние годы количество новых антибиотиков, найденных с использованием методик, основанных на культивировании микроорганизмов, существенно снизилось. Анализ почвенных метагеномных библиотек позволил обнаружить гораздо большее количество антибиотиков, присутствующих в популяциях некультивируемых микроорганизмов. Соответственно, метагеномный скрининг механизмов устойчивости к антибиотикам приводит в результате к обнаружению большого ряда механизмов, которые значительно отличаются от таковых, обнаруженных при культивировании.

Способность прокариотов деградировать органические соединения природного происхождения и большинство ксенобиотиков важна для разработки стратегий биоремедиации. При сравнении геномов бактерий, изолированных из почв, и метагенома этих сред, было определено, что гены, ответственные за ремедиацию, отличаются от таковых, обнаруженных методом культивирования. Таким образом, метагеномика может дать больше информации о разнообразии метаболических путей деградации ксенобиотиков, чем культивирование.

Из метагеномных библиотек были получены разнообразные биокатализаторы: эстеразы, нитрилгидратазы, алкогольредуктазы, амидазы, целлюлазы, α -амилазы, пектатлиазы.

Микробная экология была революционизирована с развитием филогенетических исследований, базирующихся на изучении биоразнообразия, основанного на секвенировании гена 16S рНК/ДНК. Применение универсальных праймеров для

прямой амплификации методом ПЦР генов 16S рРНК из сообщества в целом, комбинированной с клонированием и сиквенсом, позволило получить огромное количество данных и полностью пересмотреть информацию о разнообразии прокариотов.

6.2. Протеомика

Термин «протеом» был введен в употребление в 1995 г. для обозначения всей совокупности белков, кодируемых определенным геномом и экспрессируемых в определенных условиях. **Протеомика** вместе с другими «омикс»-технологиями, такими как геномикой, транскриптомикой, метаболомикой нацелена на системный анализ биологического объекта и создание функциональной модели живого организма.

Протеомные технологии используют различные высокопроизводительные методы разделения, такие как двухмерный гель-электрофорез (рис. 28), одномерный гель-электрофорез, многомерную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения.

Бактерии, способные катализировать дегалогенирование, метаногенез, денитрификацию и восстановление сульфатов широко применяются в технологиях очистки окружающей среды. Большое значение для биоремедиации имеет их устойчивость к радиации и токсичным соединениям. Протеомика играет важную роль в расшифровке метаболических путей, связанных с этими процессами. Однако образцы из окружающей среды содержат сообщество организмов, что делает исследование протеома крайне сложным. У подавляющего большинства микроорганизмов не расшифрован геном, кроме того, есть трудности в выделении бактерий и белков из некоторых сред. Несмотря на эти сложности, получила развитие метапротеомика, или протеомика микробного сообщества, которая позволяет получить информацию без изоляции отдельных организмов. Экологическая протеомика изучает протеом сообщества микроорганизмов применительно к определенному процессу – очистке сточных вод, метаболической инженерии, микробной экологии, реакции на стресс. Большим прогрессом в области экологической протеомики является возможность идентифицировать белки из

некультивируемых организмов с использованием методов биоинформатики. Экологическая протеомика, в том числе метапротеомика, дает наилучшие результаты в сочетании с другими «омикс»-технологиями, такими как метаболомика и транскриптомика.

Протеомика является эффективным инструментом для решения проблем молекулярной биологии и, в дополнение к методам изучения нуклеиновых кислот, дает возможность подтвердить существование генных продуктов, предсказанных из последовательности ДНК, что обеспечивает большой вклад в изучение геномов. Кроме того, протеомика может быть использована для филогенетической классификации бактерий с использованием 2D-карты белков или пептидных последовательностей, полученных методом масс-спектрометрии.

Протеомика может использоваться в пищевой технологии, особенно для характеристики и стандартизации сырья, разработки процессов, выявления различий между партиями, контроля качества конечного продукта и при осуществлении контроля биологической безопасности пищевых продуктов, в том числе генетически модифицированных.

Протеомные технологии представляют большой интерес для биотехнологических и фармацевтических компаний, в том числе, для поиска протеинов, которые могут иметь терапевтическое значение. Кроме того, протеомика может позволить проанализировать экспрессию ДНК, полученной в результате генной модификации, и оценить успешность генно-инженерных манипуляций.

6.3. Метаболомика

Метаболомика – это один из «омикс»-подходов, использующийся для получения полной информации о метаболитах и направленный на понимание глобального состояния метаболизма в образцах. При комбинировании с геномикой, транскриптомикой, и/или протеомикой, метаболомика помогает интерпретировать многие сложные биологические процессы.

Чтобы улучшить свойства сельскохозяйственных культур на генетическом уровне, могут быть использованы две раз-

личные стратегии: традиционная селекция и генетическая модификация; однако обе стратегии могут генерировать «непреднамеренные фенотипические эффекты» в метаболоме. В связи с этим необходимо контролировать результаты этих процессов с помощью метаболомики как системного подхода.

Биотехнологические подходы, в том числе генетическая модификация организмов, регулируют получение определенных метаболитов растений, которые могут обеспечить их адаптацию к экологическим стрессам, улучшить качество пищевых продуктов, увеличить урожайность. Синтез специфических метаболитов является одной из самых известных защитных реакций растений, поэтому метаболомный подход может дать целостное понимание защитных механизмов растения. В этом контексте метаболомика играет ключевую роль в молекулярной биотехнологии растений. К сожалению, эти подходы не обязательно приводят к ожидаемым результатам из-за высокой сложности механизмов, лежащих в основе метаболической регуляции. Хотя метаболомный анализ может быть использован для оценки влияния модифицированных и/или внедренных генов и позволяет оценить метаболическое состояние клеток, нет единого аналитического метода для изучения метаболома из-за широты спектра химических веществ, синтезируемых в растениях. Поэтому метаболомный подход в применении к различным объектам находится в стадии своего становления, интенсивно развивается и модифицируется.

6.4. Электронная, конфокальная лазерная и атомно-силовая микроскопия

Развитие методов визуализации микромира сыграло решающую роль в становлении микробиологии как науки о живых объектах, невидимых невооруженным глазом. Для решения биологических и медицинских задач уже более 300 лет широко применяется оптическая микроскопия.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) отличается от обычной флуоресцентной улучшенным разрешением вдоль оптической оси объектива, которое достигается за счет использования конфокальной фильтрации флуорес-

ценции, излучаемой образцом. Спектральная КЛСМ применима для решения разнообразных задач биофизики, молекулярной и клеточной биологии. С ее помощью можно изучать механизмы клеточного транспорта, внутриклеточную локализацию биологических молекул и проводить исследования на срезах тканей. Метод позволяет идентифицировать и разделять в исследуемых образцах перекрывающиеся сигналы нескольких флуоресцирующих соединений и учитывать вклад эндогенной флуоресценции.

Принцип действия атомно-силового микроскопа заключается в сканировании поверхности образца атомарно острой иглой (зондом), расположенной на конце кантилевера. Силы взаимодействия, возникающие между поверхностью исследуемого образца и зондом при их сближении, приводят к изгибу кантилевера. Деформацию кантилевера обычно регистрируют фотодетектором, на который падает луч лазера, отраженный с тыльной стороны кантилевера. Неровности образца вызывают его изгиб, что приводит к отклонению луча. Регистрируемая величина изгиба в процессе сканирования формирует трехмерный рельеф поверхности в режиме реального времени (рис. 29).

В микробиологии задача обнаружения и распознавания бактерий и отдельных молекул достаточно актуальна. Она может решаться путем их специфического маркирования с последующим микроскопическим исследованием. В случае использования световой микроскопии используются иммунохимические или иммунофлуоресцентные метки, а при электронной микроскопии распознающие антитела конъюгируются с электронно-плотными частицами, например, коллоидным золотом. АСМ-детекторы позволяют визуализировать отдельные молекулы белков и подсчитывать их количество без ограничений в концентрации чувствительности. Принцип работы такого молекулярного АСМ-детектора основан на выявлении различий в морфометрических характеристиках визуализируемых молекул. Например, критерием для выявления комплексов «антиген–антитело» может выступать высота белкового комплекса, которая будет значительно больше высоты составляющих этот комплекс молекул.

Перспективным направлением является использование АСМ для диагностики различных заболеваний. Основой диагностики являются миниатюрные тест-системы (биочипы), в которых используется принцип молекулярного узнавания. АСМ успешно применяется для диагностики и быстрой количественной оценки вирусных частиц, идентификации микроорганизмов, визуализации единичных биомолекул, исследования влияния различных веществ на жизнедеятельность клеток, для контроля структуры и стабильности нанопереносчиков, используемых для доставки лекарственных средств. Более сложные методы детекции методом АСМ заключаются в использовании функционализированных зондов – сверхчувствительных нано/биосенсоров.

С помощью АСМ возможно проводить исследования влияния на морфологию микроорганизмов и их поверхности различных веществ: наноматериалов, растворителей и субстратов в биотехнологических процессах, токсичных веществ (рис. 30), антибиотиков. АСМ может быть использован для оценки влияния новых препаратов с антимикробной активностью на бактериальные клетки-мишени.

Электронная микроскопия, в том числе сканирующая, преодолевает ограничения в разрешающей способности, которые существуют в световой микроскопии. Сканирующая электронная микроскопия дает объемные изображения микро- и нанообъектов и может быть применена для визуализации микробных клеток, в том числе иммобилизованных (рис. 31), что может дать дополнительную информацию о поверхности материалов, используемых в качестве носителя микробных клеток в биокатализе и структуре гетерогенных биокатализаторов.

Контрольные вопросы

1. В чем состоят биотехнологические задачи метагеномных исследований?
2. Какую роль в биотехнологии выполняют протеомные исследования?
3. В чем смысл метаболомного подхода в биотехнологии?
4. Какую информацию, значимую для биотехнологии, можно получить, используя современные методы микроскопии?
5. В чем заключается принцип действия конфокальной лазерной сканирующей, атомно-силовой, электронной микроскопии?

Top Class Classification Results

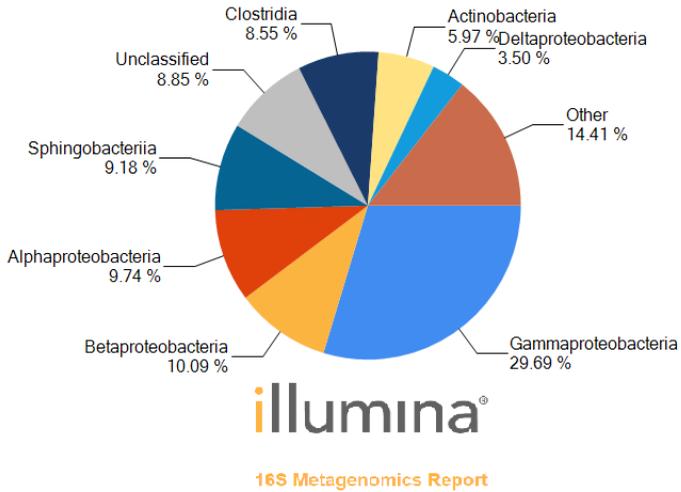


Рис. 27. Пример отчета метагеномного исследования бактериального сообщества

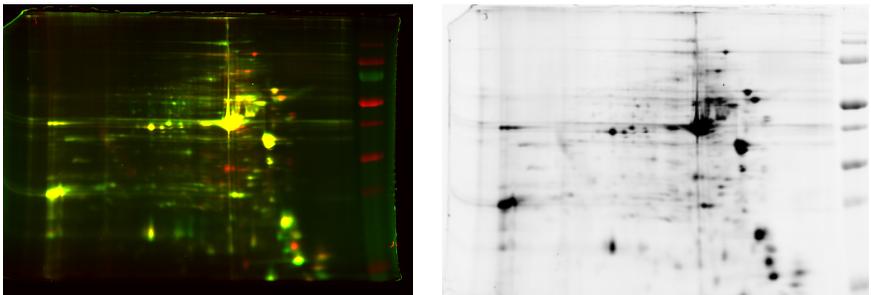


Рис. 28. 2D-электрофорез протеома эукариотических клеток (пример)

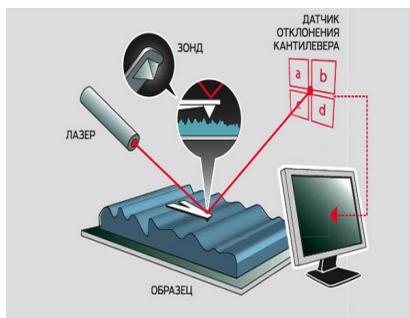


Рис. 29. Принцип работы АСМ [URL: http://www.ckpgene.ru/left/atomno-silovaya_mikroskopiya/]

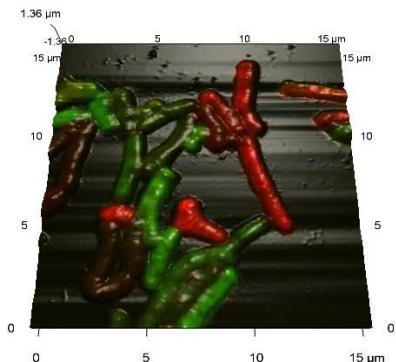


Рис. 30. АСМ/КЛСМ-изображение бактерий *Rhodococcus ruber* после обработки акрилонитрилом [Дис. ... к.б.н. Максимовой А.В.]. Микроскопия выполнена в *Rhodococcus*-центре ПГНИУ

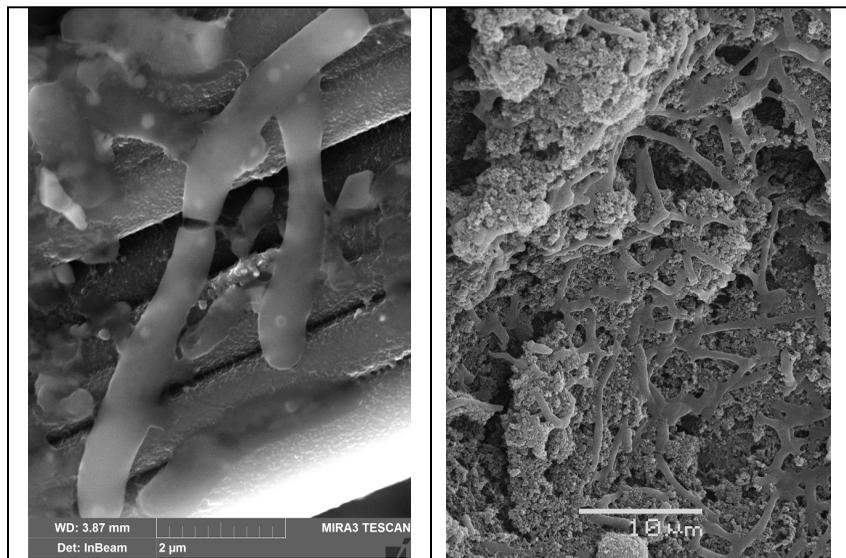


Рис. 31. Электронная сканирующая микроскопия клеток родококков, адгезированных на углеродных носителях

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анюшева М.Г., Калужный С.В. Анаэробное окисление аммония: микробиологические, биохимические и биотехнологические аспекты // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127, № 1. С. 34–43.
2. Биотехнология. Принципы и применение / под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. М.: Мир, 1988. 480 с.
3. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС, 2004. 296 с.
4. Волова Т.Г. Биотехнология. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1999. 252 с.
5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. 589 с.
6. Дьяков М.С., Цыбина А.В., Груздева У.В. Технологии переработки и обезвоживания осадков сточных вод: ретроспектива и перспективные направления развития // Вестник Перм. нац. исслед. политех. ун-та. Прикладная экология. Урбанистика. 2014. № 3. С. 111–126.
7. Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов. Л.: Изд-во ЛГУ, 1983.
8. Каллистова А.Ю., Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А. и др. Роль анаэробных бактерий в очистке сточных вод от соединений азота // Микробиология. 2016. Т. 85, № 2. С. 126–144.
9. Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М.: Академия, 2005. 400 с.
10. Кулуев Б.Р. и др. CRISPR/Cas и редактирование геномов растений // Биомика. 2017. Т. 9, № 3. С. 155–182.
11. Куц В.В. и др. Биолюминесцентный мониторинг экотоксикантов (экологическая люминометрия) // Вода: химия и экология. 2011. №10. С. 47–53.
12. Маскалева С.Е., Большаков Н.Ю. Математическое моделирование и внедрение эффективных биотехнологий очистки от азота и фосфора на действующих очистных сооружениях канализации // СтройПрофи. 2012. № 4. С. 56–59.
13. Маслова О.В., Сенько О.В., Холстов А.В., Исмаилов А.Д., Ефременко Е.Н. Имобилизованные клетки бактерий, об-

- ладающих биолюминесценцией, в системах биодетекции и экомониторинга // Иммуобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы / под ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. 500 с.
14. Немудрый А.А. и др. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий // *Acta naturae*. 2014. Т. 6, № 3 (22). С. 20–42.
 15. Нетрусов А.И. Введение в биотехнологию. М.: Издательский центр «Академия», 2014. 288 с.
 16. Никиян А.Н., Татлыбаева Е.Б. Успехи и перспективы развития атомно-силовой микроскопии в микробиологии // *Вестник Оренбург. гос. ун-та*. 2014. №6 (167). С. 112–119.
 17. Ножевникова А.Н., Симанькова М.В., Литти Ю.В. Использование микробного процесса анаэробного окисления аммония (аннамокс) для биотехнологической очистки стоков // *Биотехнология*. 2011. № 5. С. 8–31.
 18. Пиневиц А.В. Микробиология: учебник. Т. III. СПб.: Изд-во СПбУ, 2009. 455 с.
 19. Плотникова Е.Г. и др. Цельноклеточные бактериальные биосенсоры для детекции ароматических углеводородов и их хлорированных производных (Обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2016. Т. 52, № 4. С. 353–364.
 20. *Прикладная экобиотехнология: учеб. пособие : в 2 т. Т. 1 / А.Е. Кузнецов [и др.] ; 2-е изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 629 с .*
 21. Сироткин А.С., Кирилина Т.В., Семенова Е.Н., Халилова А.А. Биофильтрация сточных вод: учеб. пособие. Казань: Изд-во Казан. науч.-исслед. техн. ун-та, 2014. 172 с.
 22. Сироткин А.С., Шагинурова Г.И., Ипполитов К.Г. Агрегация микроорганизмов: флокулы, биопленки, микробные гранулы. Казань: Изд-во «ФЭН» АН РТ, 2007. 160 с.
 23. Субботин В.В., Конопаткин А.А. Биотехнология культивирования микроорганизмов
(URL: <http://kursak.net/biotexnologiya-kultivirovaniya-mikroorganizmov/>)
 24. Трошкова Г.П., Емельянова Е.К., Карабинцева Н.О. Экологическая биотехнология: учеб. пособие. Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 2011. 144 с.

25. Управление отходами. Механобиологическая переработка твердых бытовых отходов. Компостирование и вермикомпостирование органических отходов: монография / Я.И. Вайсман [и др.]; под ред. Я.И. Вайсмана. Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политех. ун-та, 2012. 225 с.
26. Феофанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях // Успехи биологической химии. 2007. Т. 47. С. 371–410.
27. Харьков С.В. Организация процессов удаления фосфора из сточных вод // Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение. 2013. Т. 11 (71). С. 52–58.
28. Okazaki Y., Saito K. Recent advances of metabolomics in plant biotechnology // Plant Biotechnol. Rep. 2012. Vol. 6. P. 1–15.
29. Steele H.L., Streit W.R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology // FEMS Microbiology Letters. 2005. Vol. 247. P. 105–111.

Учебное издание

Максимова Юлия Геннадьевна
Максимов Александр Юрьевич

Биоресурсы и биотехнологии. Основы биотехнологии

Учебное пособие

Редактор *Л. Л. Савенкова*
Корректор *Л. И. Соболева*
Компьютерная вёрстка: *Ю. Г. Максимова*

Подписано в печать 22.05.2019. Формат 60×84/16.
Усл. печ. л. 6,05. Тираж 100 экз. Заказ 94

Издательский центр
Пермского государственного
национального исследовательского университета.
614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15

Типография ПГНИУ.
614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15