

# ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

## ПРАКТИКУМ

НАПРАВЛЕНИЕ ПОДГОТОВКИ  
19.03.01– БИОТЕХНОЛОГИЯ  
(ПРОФИЛЬ БИОТЕХНОЛОГИЯ)

РАЗУМКОВА Г.М., РЕШЕТНИКОВА О.В.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ  
«ЛЕНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени А.С. ПУШКИНА»

ЛУЖСКИЙ ИНСТИТУТ (ФИЛИАЛ)

# ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

## ПРАКТИКУМ

Разумкова Г.М., Решетникова О.В.

НАПРАВЛЕНИЕ ПОДГОТОВКИ  
19.03.01– БИОТЕХНОЛОГИЯ  
(ПРОФИЛЬ БИОТЕХНОЛОГИЯ)

Луга  
2021

УДК 60

ББК 30

О-75

**Рецензент:**

*Кулёв Д.Х. - д.т.н., профессор кафедры биотехнологии, технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции Лужского института (филиала) ЛГУ им. А.С. Пушкина*

*Сбойчаков В.Б. - д.м.н. профессор кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования Министерства обороны Российской Федерации Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова*

**Автор**

*Разумкова Г.М., Решетникова О.В.*

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ [Электронный ресурс]: практикум– Эл. изд. - Электрон. Текстовые дан. (1 файл pdf: 94 с.). - Разумкова Г.М., Решетникова О.В. 2021. – Режим доступа: <http://scipro.ru/conf/basicsbio technology.pdf>. Сист. требования: Adobe Reader; экран 10".

DOI 10.54092/9781794803473

ISBN 978-1-7948-0347-3

Практикум предназначен для студентов, обучающихся по направлению 19.03.01 «Биотехнология» очной формы обучения. В практикуме представлены лабораторные работы по дисциплине «Основы биотехнологии», техника безопасности при работе в биотехнологической лаборатории, контрольные вопросы по лабораторной работе, задачи, список литературы, требования к оформлению лабораторных работ. Практикум составлен в соответствии с требованиями ФГОС ВО. Представленные материалы могут быть использованы для подготовки бакалавров на биотехнологическом факультете Лужского института (филиала) ЛГУ имени А.С. Пушкина.

ISBN 978-1-7948-0347-3



© Разумкова Г.М., Решетникова О.В. 2021  
© Ленинградский государственный университет (ЛГУ)  
имени А.С. Пушкина, Лужский институт (филиал), 2021  
© Оформление: издательство НОО Профессиональная наука, 2021

## Содержание

Введение.....	5
Правила техники безопасности в лаборатории .....	6
<i>Лабораторная работа № 1</i> .....	16
<i>Практическая работа № 2</i> .....	20
<i>Лабораторная работа № 3</i> .....	21
<i>Лабораторная работа № 4</i> .....	24
<i>Лабораторная работа № 5</i> .....	31
<i>Лабораторная работа № 6</i> .....	34
<i>Лабораторная работа № 7</i> .....	36
<i>Лабораторная работа № 8</i> .....	40
<i>Лабораторная работа № 9</i> .....	43
<i>Лабораторная работа № 10</i> .....	46
<i>Лабораторная работа № 11</i> .....	48
<i>Лабораторная работа № 12</i> .....	50
<i>Практическая работа № 13</i> .....	53
<i>Лабораторная работа № 14</i> .....	54
<i>Лабораторная работа № 15</i> .....	58
<i>Лабораторная работа № 16</i> .....	60
<i>Лабораторная работа № 17</i> .....	62
<i>Лабораторная работа № 18</i> .....	65
<i>Лабораторная работа № 19</i> .....	69
Список литературы .....	87
Приложение .....	89

## Введение

Современные биотехнологии предлагают принципиально новые пути для формирования нового и ценного для жизнедеятельности человека генетического разнообразия растений посредством отбора форм и клонов особей с искомыми признаками.

Культивирование изолированных клеток и тканей растений в условиях *in vitro* – метод сохранения жизнеспособности и размножения органов или их частей, участков тканей или отдельных клеток вне организма растений донора. В асептических условиях клетки и ткани служат в качестве биологических моделей, на которых в строго контролируемых условиях, близких во многих случаях к естественным условиям, предоставляется возможность изучения механизмов межклеточных взаимодействий, контактов, их регуляторных функций.

В основе методических приемов культивирования клеток и тканей *in vitro* лежат три следующих принципа:

- изолирование экспланта (клетка, фрагмент ткани, орган) от исходного растения;
- перенос экспланта в строго контролируемые, тщательно подобранные условия;
- соблюдение стерильных условий выращивания материала.

Метод культуры изолированных клеток, тканей и органов растений в условиях *in vitro* является самостоятельной отраслью биотехнологии. Это связано как с увеличением роли клеточных культур в фундаментальных исследованиях по генетике и молекулярной биологии, физиологии и цитозембриологии растений. Так и с возможностями практического использования клеточных и тканевых технологий в агропромышленном комплексе, фармацевтической и пищевой промышленности.

В практикуме к лабораторным занятиям приведены методики выполнения практических работ по культивированию растений *in vitro*: микрклональное размножение, оздоровление посадочного материала.

Практикум посвящен вопросам биотехнологии размножения растений (включая культуры клеток, тканей, органов и клонов растений), включает краткий теоретический материал по основным направлениям современной биотехнологии, а так же подробное описание практических занятий. В конце каждой темы приводятся вопросы для самоконтроля.

Практикум предназначен для студентов, обучающихся по направлению подготовки 19.03.01-Биотехнология. Представленные в практикуме практические и лабораторные работы, будут способствовать усвоению студентами материала по изучаемой дисциплине, практическому овладению техникой экспериментальных исследований, приобретению навыков работы с лабораторным оборудованием, проведению анализа полученных данных, формированию профессиональных компетенций.

## Правила техники безопасности в лаборатории

Биотехнологические лаборатории размещаются в нескольких помещениях, которые в зависимости от объема работы и целевого назначения имеют определенную площадь, строение и оснащение.

*В каждой биотехнологической лаборатории предусмотрены:*

- а) комнаты для работы с химическими реактивами и для приготовления питательных сред, буферных растворов и реактивов, где имеются лабораторные столы, шкафы вытяжные, шкафы для хранения реактивов и посуды, аналитические весы, рН-метр, электроплитки, водяные бани, магнитная мешалка, холодильники и шкафы (стеллажи) для хранения растворов, реактивов и готовых сред;
- б) помещения для стерилизации инструментов, посуды и питательных сред, в которых расположены сухожаровые шкафы, автоклавы, стеллажи и столы для размещения сред, инструментов и посуды (причем стерильные и нестерильные материалы размещаются отдельно), аппараты для получения дистиллированной и бидистиллированной воды;
- в) моечные комнаты, оснащенные мойками с горячей и холодной водой, аппаратами для получения дистиллированной воды, сосудами с дистиллированной и бидистиллированной водой, сушильными шкафами и стеллажами для хранения посуды;
- г) боксы (ламинарные боксы) или комната для проведения работ с отдельными группами биообъектов (растения, клетки, ткани, бактерии) – посев на питательные среды, выделение нуклеиновых кислот;
- д) культуральные комнаты, состоящие из двух отделений:
  - световое отделение, где регулируются температура и влажность воздуха, интенсивность освещения, предназначено для выращивания растительных культур на стеллажах с фиксированными и/или передвижными полками или суспензионных культур на шейкерах, роторных установках;
  - темновое отделение, оснащённого тем же оборудованием, что и световое, исключая источники освещения (можно использовать и термостаты);
- е) лабораторные помещения для изучения биообъектов, например растительных культур, где имеются весы, микроскопы, растворы красителей, предметные стекла и другое необходимое оборудование;
- ж) помещение с холодильно-морозильными установками для сохранения культур растений, бактерий, выделенных нуклеиновых кислот;
- з) оранжереи и теплицы, в которых выращивают растительный материал, необходимый для исследований, или высаживают растения, полученные в ходе экспериментов;
- и) ПЦР - лаборатория, которая обязательно должна быть разделена на три зоны по числу технологических операций: зона подготовки реакционной смеси («чистая



зона»), зона подготовки проб и электрофоретическая комната. Перемещение пробирок, штативов и других необходимых приборов должно производиться только в одном направлении, при этом потоки не должны пересекаться.

Все производственные комнаты должны быть снабжены необходимым оборудованием и расходными материалами, в том числе халатами, закрепленными за соответствующими помещениями.

к) желательно предусмотреть отдельные помещения для переодевания и хранения верхней одежды, приема пищи, складское помещение для лабораторных материалов.

Так как большая часть работ по генной инженерии и молекулярной биологии растений выполняется в стерильных условиях (ламинар-бокс, боксовые помещения), то необходимо соблюдать следующие требования:

- 1) полы в лаборатории подлежат ежедневной влажной уборке с применением 1 % раствора хлорамина;
- 2) в начале и в конце рабочего дня боксовые помещения и предбоксы облучают бактерицидной лампой в течение 40–60 мин;
- 3) перед началом и по окончании работ поверхность стола обрабатывают тампонами, смоченными 96 % этиловым спиртом.

Запрещается входить в бокс при включенной бактерицидной или ртутно-кварцевой лампе. Работу можно начинать только спустя 30–40 мин после выключения ламп.

В боксе и предбоксе не должно быть лишних предметов и оборудования, не предназначенных для работы, загромождающих выход из них и доступ к средствам пожаротушения.

Работать в боксе необходимо в спецодежде (халат, шапочка, сменная обувь, иногда – марлевая повязка).

Запрещается использовать спецодежду, предназначенную для работы в боксе, если на ней имеются следы от пролитых легковоспламеняющихся или горючих жидкостей.

Запрещается иметь в боксе легковоспламеняющиеся и горючие жидкости при работе со спиртовкой, а также исключается использование нательного белья из синтетических материалов.

Прежде чем зажечь спиртовую горелку, необходимо убедиться, что в ней нет неисправностей, поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир др.). Зажигать спиртовку можно только спичкой. Для тушения пожара, возникшего от загорания спирта (спиртовки), можно использовать воду или ткань, обильно смоченную водой.

Работы в боксе осуществляются при наличии одновременно не менее двух сотрудников.

При работе на автоклавах необходимо руководствоваться правилами эксплуатации и техники безопасности:

- к обслуживанию автоклава могут быть допущены лица, достигшие 18 лет, прошедшие специальный инструктаж по безопасному обслуживанию автоклавов и имеющие удостоверение о сдаче технического минимума по их устройству и эксплуатации;

- автоклавы с электрическим нагревом должны быть заземлены. Пол стерилизационного помещения у рабочих мест изолируется резиновыми ковриками или деревянными решетками;

- персонал, обслуживающий автоклавы, должен вести рабочий журнал, в котором записываются дата, время, режим стерилизации, кто проводил стерилизацию;

- открывание крышки автоклава, а также его ремонт разрешается только при полном отсутствии давления в автоклаве;

- во время открытия крышки автоклава обслуживающий персонал должен находиться в стороне от крышки;

- при выгрузке из автоклава или сушильного шкафа стеклянной посуды следует пользоваться матерчатыми рукавицами или трикотажными перчатками.

Работы с использованием электрооборудования и электроприборов (шейкеры, электроплитки, водяные бани, микроволновые печи и др.) должны проходить под наблюдением лаборанта.

При неисправности в работе электроприбора (например, подсветка в микроскопе) необходимо обратиться к преподавателю (лаборанту). Чинить самостоятельно приборы запрещается.

Необходимо ставить электронагревательные приборы не на деревянную поверхность стола, а только на теплоизоляционный слой (асбест и др.).

Нельзя ставить на электроплитку мокрые колбы и стаканы для нагревания, а также на разогретую плитку холодные колбы и другую стеклянную посуду (даже термостойкую).

Во избежание ожогов при нагревании и прокаливании никогда не следует брать голыми руками нагретые колбы, стаканы, чашки и др. посуду, их необходимо обернуть полотенцем. Также следует принимать меры предосторожности при вытаскивании колбы с кипящей агарозой из микроволновой печи, так как при встряхивании колба может резко вскипеть, что приведет к ожогу.

При работе с водяной баней нельзя пробовать степень нагрева воды рукой, необходимо следить за тем, чтобы в ней всегда была вода и выставлена нужная температура.

Шейкер должен быть заземлен и установлен на ровной горизонтальной поверхности в отдельном помещении. Включать шейкер следует после правильного и прочного закрепления колб в гнездах, балансирования ее правильной установкой колб. Необходимо убедиться в исправности шейкера, осмотрев при этом все узлы и крепежные детали. По окончании работы следует: отключить шейкер-качалку от



электросети и снять колбы; произвести запись в рабочем журнале о замеченных отклонениях в работе.

Запрещается: устанавливать колбы без амортизационных колец; производить запуск шейкера без проверки масла в подшипниках; работать на неисправном и незаземленном шейкере; устанавливать число оборотов выше указанного в паспорте.

Перед тем как проводить центрифугирование, необходимо обратить внимание, какие пробирки подходят к установленному ротору и какие адаптеры нужно установить. Прежде чем поместить центрифужные пробирки в центрифугу, их необходимо уравновесить. Не следует останавливать ротор центрифуги рукой.

*Работы с химическими реактивами и соблюдение правил техники безопасности.*

Опыты с ядовитыми веществами и веществами, которые имеют сильно выраженный запах, можно проводить только в вытяжном шкафу.

Работа с горючими и легковоспламеняющимися веществами, горючими жидкостями должна проводиться в вытяжном шкафу и только при включенной вентиляции и при выключенных электроприборах и газовых горелках.

Перегонять и нагревать низкокипящие огнеопасные вещества (ацетон, бензол, эфиры, спирты и т. д.) необходимо в круглодонных колбах, изготовленных из тугоплавкого стекла на водяных или масляных банях, пользуясь при этом обратным холодильником в зависимости от температуры кипения данного вещества.

Отработанные горючие жидкости собирают в специально герметично закрывающуюся тару, которую в конце рабочего дня должны выносить из лаборатории для регенерации или уничтожения этих жидкостей. Для этих целей должны быть разработаны инструкции. Спуск горючих жидкостей в канализацию запрещается!

В случае разлива огнеопасных жидкостей необходимо немедленно выключить нагревательные приборы. Жидкость следует засыпать песком, который затем убрать деревянным совком и лопатой.

Все работающие с концентрированными едкими щелочами и кислотами по приготовлению растворов фенола, формалина, перекиси водорода, хлорамина и др. обязаны пользоваться защитными очками, резиновыми перчатками, прорезиненным фартуком и сапогами.

Запрещается ходить по лаборатории с концентрированными кислотами и щелочами, наливать их нужно только в отведенном для этого месте необходимо внимательно следить за тем, чтобы реактивы не попадали на лицо, руки и одежду.

При приготовлении растворов серной, азотной и других кислот их необходимо вливать в воду тонкой струйкой при непрерывном помешивании. Доливать воду в кислоту запрещается!

При разбавлении концентрированной серной кислоты, смешивании концентрированных серной и азотной кислот и вообще при смешивании веществ,

сопровождающемся выделением тепла, пользоваться только толстостенной химической или фарфоровой посудой. Расфасовка кислот производится с применением специальных сифонов и насосов.

Недопустимо набирать кислоту в пипетку ртом. Для наполнения пипеток следует пользоваться резиновой грушей или другим приспособлением.

Растворять твердые щелочи следует путем медленного добавления их небольшими кусочками к воде при непрерывном перемешивании. Кусочки щелочи нужно брать только щипцами.

Отработанные кислоты и щелочи собираются в специальную посуду, после нейтрализации сливаются в канализацию или в специально отведенное место. Минеральные кислоты нейтрализуют окисью магния или порошкообразной гашеной известью. Отработанные растворы минеральных кислот и едких щелочей допустимо дегазировать путем их смешивания, прибавляя небольшими порциями более концентрированный раствор к менее концентрированному раствору. Средствами для нейтрализации пролитой щелочи служит борная кислота или уксусная эссенция (одна часть эссенции на восемь частей воды), для кислот – 5 % раствор соды.

Разлитые кислоты или щелочь необходимо немедленно засыпать песком или нейтрализовать, после чего провести влажную уборку.

При переливании жидкости нужно использовать воронки. На всех банках, склянках и на любой другой посуде, в которой хранятся вещества, должны быть указаны их химическое название, молекулярная формула, данные фирмы-производителя, условия хранения, дата, до которой продукт годен к употреблению.

Не следует оставлять открытыми банки с реактивами. Не загрязнять реактивы во время работы (не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы; избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку; пользуясь пипеткой, набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой, ни в коем случае не путать их).

Категорически запрещается пробовать химические вещества на вкус. Нюхать вещества можно лишь осторожно, не вдыхая волной грудью, не наклоняясь над сосудом, а направляя к себе пары или газ движением руки.

Сухие реактивы брать с помощью лопаток, пластмассовых или металлических шпателей. Шпатель должен быть всегда сухим и чистым. После расходования следует его тщательно обтереть. Если реактив «слежался», чтобы его извлечь из банки, используют шпатель (вымытый и прокалённый).

Нельзя держать в руках банку или стакан с реактивом, ее надо поставить на лабораторный стол и только после этого открывать.

При наливании реактивов нельзя наклоняться над сосудом, предотвращая попадания брызг на лицо или одежду.

Если к работе не дано указаний относительно дозировки реактивов, то брать их для проведения опытов необходимо в возможно меньшем количестве.

Для взвешивания химических веществ нужно учитывать диапазон и точность весов. С весами нужно обращаться всегда очень осторожно. Без нужды не следует переставлять весы с места на место.

Весы и место около них всегда должны быть чистыми. Если при взвешивании весы случайно окажутся загрязненными, надо немедленно вытереть их (ни в коем случае не сдувать!). Нужно аккуратно снять чашку (и, если надо, верхний кожух весов); кожух вымыть и насухо протереть; весы протереть влажной тряпкой/салфеткой, насухо вытереть.

Для взвешивания всегда надо пользоваться какой-либо тарой или калькой. Нельзя насыпать непосредственно на чашку весов никаких веществ.

Легколетучие реактивы (такие как РНК-азы, ДНК-азы, протеиназы, бактериальные среды, SDS) взвешиваются с предосторожностями только под тягой, чтобы не загрязнить «окружающую среду».

Особая предосторожность и аккуратность необходимы при работе с ферментами, так как это самый уязвимый компонент реакции, требующий определённых рН, концентрации солей и температуры. Поэтому он вносится в последнюю очередь, когда все остальные компоненты уже добавлены и смешаны! В реакцию нужно брать точно указанное (или только чуть большее) количество ферментов. Слишком большие количества ферментов опасно брать в реакцию, так как все ферменты содержат примеси, и иногда избыток фермента не только бесполезен, но и вреден.

Работать нужно с небольшими аликвотами ферментов, а не с исходными пробирками (если с ферментом что-то случится (загрязнение, инактивация), то будет потеряна лишь часть).

Пробирки с растворами ферментов следует хранить в надёжном морозильнике, извлекать из морозильника непосредственно перед внесением и как можно быстрее убирать обратно.

Пробирку с ферментом следует держать пальцами с боков на том уровне, на котором раствора фермента нет. На время проведения работ 0,2–0,5 мл эппендорф с ферментом можно помещать в охлаждённый эппендорф большего объема (например, 1,5 мл) и использовать его как адаптер или помещать в криоштатив (можно обыкновенный штатив для эппендорфов ставить на лед).

Перед тем как открыть пробирку, нужно кратковременным (~2–5 мин) центрифугированием на vortexe сбросить её содержимое на дно.

Для проведения работ в биологических лабораториях используют стеклянную и пластиковую посуду.

Пластиковая посуда (чашки Петри, наконечники для автоматических пипеток-дозаторов, пробирки-эппендорфы, центрифужные пробирки и т.д.) выпускается из пластика разного типа, поэтому нужно обращать внимание на маркировку, чтобы знать, какие химические вещества, реагенты и агрессивные смеси данный пластик выдерживает.

Стеклопосуда всегда должна быть чисто вымыта и ополоснута дистиллированной водой.

Запрещается пользоваться разбитой или треснувшей посудой, ставить ее непосредственно на огонь и убирать битое стекло незащищенными руками. Битое стекло следует складывать в специально отведенную емкость.

Все работы со стеклянной посудой необходимо проводить в защищенных очках. При работе со стеклом руки защищают полотенцем или куском материи во избежание травмирования.

При смешивании или разбавлении веществ, сопровождаемых выделением тепла, следует пользоваться термостойкой стеклянной или фарфоровой посудой. Нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой до тех пор, пока он не охладится.

Во избежание ожогов при нагревании и прокаливании никогда не следует брать голыми руками нагретые колбы, стаканы, чашки и пр., их необходимо обернуть полотенцем. Нагретые колбы нельзя ставить на холодную (мокрую, металлическую) поверхность. Переноса сосуды с горячей жидкостью, надо держать их двумя руками: одной – за дно, другой – за горловину, используя при этом полотенце (чтобы избежать ожогов кистей и пальцев рук).

Размешивать реакционную смесь в сосуде стеклянной палочкой или шпателем надо осторожно, не допуская разлома сосуда, при этом необходимо держать сосуд за горловину.

Любая посуда (пробирки, колбы, стаканы, чашки Петри и пр.), с которой проводятся работы, должна быть подписана. Чаще всего чашки Петри подписываются только снизу (со стороны агар-агара), чтобы не перепутать их, если приходится работать одновременно с двумя чашками. Обычно чашка Петри подписывается два раза.

Первый раз при заливке указываются: среда; гормоны, антибиотики и другие добавки; дата (число и месяц).

Второй раз при высеве культуры (калусной культуры растений, бактерий) указываются: название культуры, микроорганизмов, плазмиды или библиотеки; дата посева.

Все три зоны должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксниками и устройством фильтрации воздуха.

При наличии специальных боксов допускается объединение зоны подготовки реакционной смеси и зоны пробоподготовки, но комната для проведения электрофореза должна размещаться как можно дальше от двух других зон и иметь не связанную с другими зонами систему вентиляции. Это является одним из наиболее категорических требований при организации ПЦР-лаборатории.

Подготовку реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксе, снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света.

Запрещается внесение пробирок с положительными контролями как до, так и после обработки в комнату подготовки реакционной смеси («чистую зону»).

Исследуемый материал необходимо как можно быстрее обработать в комнате пробоподготовки. В эту же комнату должны поступать пробирки реакционной смесью из «чистой зоны» для внесения в них препаратов ДНК.

*Оказание первой помощи при несчастных случаях.*

*Меры первой помощи при ожогах.*

При термических ожогах на обожженное место нужно положить ватку, смоченную слабым раствором перманганата калия.

*Меры первой помощи при порезе.*

В случае пореза стеклом нужно сначала внимательно осмотреть рану извлечь из нее осколки стекла, если они есть, а затем обмыть раненное место 2 % раствором перманганата калия, смазать йодом и завязать бинтом или заклеить лейкопластырем.

*Меры первой помощи при отравлениях неорганическими веществами.*

*Азотная кислота.* Свежий воздух, покой, тепло. Вдыхание кислорода. Сульфадимезин или иной сульфаниламидный препарат (2 г), аскорбиновая кислота (0,5 г), кодеин (0,015 г). Искусственное дыхание. Консультация врача.

*Серная кислота.* Свежий воздух. Промыть верхние дыхательные пути 2 % раствором питьевой соды. В нос – 2–3 капли 2 % раствора эфедрина. Теплое молоко с содой, кодеин (0,015 г) или дионин (0,01 г). При попадании в органы пищеварения смазать слизистую рта 2 % раствором дикаина. Промывание желудка большим количеством воды. Внутрь принять: столовую ложку оксида магния на стакан воды каждые 5 мин, яичный белок, молоко, крахмальный клейстер, кусочки сливочного несоленого масла, кусочки льда. Нельзя вызывать рвоту и применять карбонаты. Консультация врача. При попадании на кожу или одежду кислоты надо смыть ее большим количеством воды, а затем 3–5 % раствором питьевой соды или разбавленным раствором аммиака.

*Щелочи.* Вдыхание теплого водяного пара (в воду добавить немного лимонной кислоты). Внутрь – теплое молоко с медом, кодеин (0,015 г) или дионин (0,01 г). Горчичники. При попадании в органы пищеварения смазать слизистые оболочки рта и горла 1 % раствором новокаина.

Внутрь – по столовой ложке 1 % раствора лимонной кислоты каждые 3–5 мин, крахмальный клейстер с добавлением лимонной или уксусной кислоты, 2–3 столовые ложки растительного масла, кусочки льда. Консультация врача.

При попадании на кожу или одежду щелочи, после смывания ее большим количеством воды, нужно провести обработку 2–3 % раствором борной, лимонной или уксусной кислот.

*Меры первой помощи при отравлениях органическими веществами*

При отравлении эфиром, хлороформом, спиртом: свежий воздух; внутрь 0,03 г фенамина, или 0,1 г коразол, или 30 капель кордиамина, или 0,5 г камфоры. Искусственное дыхание и вдыхание кислорода.

*Меры первой помощи при поражении электрическим током*

Если пострадавший находится в соприкосновении с токоведущими частями, необходимо немедленно выключить ток с помощью пускателя, или вывернуть охранную пробку, или перерубить токопроводящий провод изолированным инструментом. Пострадавшего, пока он находится под током, нельзя касаться незащищенными руками (без резиновых перчаток). Если пострадавший потерял сознание, после выключения тока нужно немедленно, не дожидаясь врача, делать искусственное дыхание.

*Правила проведения и сдачи лабораторных работ*

Обучающиеся допускаются к работе в лаборатории только после инструктажа по технике безопасности, после чего они обязаны расписаться в журнале. Это означает, что они ознакомлены с правилами техники безопасности и обязуются их выполнять.

Перед началом работы необходимо внимательно ознакомиться с устройством и принципом работы установки и порядком выполнения работы (методикой расчета). Работу начать с разрешением преподавателя или лаборанта.

На лабораторном столе должны выполняться опыты, которые не представляются опасными для окружающих. В вытяжном шкафу выполняются все опыты с токсичными веществами.

При работе с электроприборами обращать внимание на их исправность, правильную изоляцию контактов, не использовать приборы с оголенными контактами, неисправными вилками и т.п.

Выполнять все меры предосторожности при работе с аппаратами с движущимися частями (электрическая мешалка, центрифуга и т.д.).

При проведении опытов нельзя отвлекаться и оставлять приборы без наблюдения.

*Общие требования к проведению работ:*

- Необходимо рационально строить свою работу.
- Все работы проводить точно и аккуратно.
- Работать следует быстро, но без спешки, которая неизбежно приводит к порче поставленного опыта.
- Лабораторный стол нужно содержать в чистоте и не загромождать лишней посудой, реактивами, посторонними предметами.
- Выполнять работы в специально отведенных помещениях и на специальном оборудовании.
- По окончании работы необходимо привести в порядок лабораторный стол.
- Реактивы необходимо расходовать экономно.

- Не принимать пищу в лабораторных помещениях и из лабораторной посуды.
- Работу с легковоспламеняющимися химическими веществами следует проводить в резиновых перчатках, прорезиненных фартуках и защитных очках, защитной маске.
- Во всех лабораториях всегда должны быть ящики с песком, огнетушители и противопожарные одеяла.
- Прежде чем приступить к работе, нужно ознакомиться с методикой выполнения и с соответствующими специальными правилами по эксплуатации оборудования или приборов.
- Категорически запрещается оставлять действующие приборы без наблюдения.

Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде. Работать в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате.

*Требования к отчету по лабораторной работе.*

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

После проведения работы студент оформляет и сдает отчет, который должен содержать следующие разделы:

- тема работы;
- цель работы;
- список оборудования и принадлежности;
- исходные данные;
- порядок проведения работы или методика расчета;
- экспериментальная и расчетная часть;
- выводы и ответы на контрольные вопросы (в письменной форме).

После оформления студент защищает отчет по лабораторной (расчетной) работе.

Студент не допускается к следующей работе, если им не сданы две предыдущие работы (без уважительных причин).

При пропуске занятия студент отрабатывает пропущенное занятие в назначенное время.



## Лабораторная работа № 1

### Организация, оборудование, правила работы в биотехнологической лаборатории

*Цель работы:* изучить организацию биотехнологической лаборатории, правила работы и используемое оборудование.

*Задачи:*

1. Познакомиться с основными направлениями современной биотехнологии.
2. Получить инструктаж по технике безопасности проведения работ в лаборатории биотехнологии.
3. Просмотреть фильм «Можно ли жить вечно?».
4. Выполнить задания к практической работе.

*Теоретическое обоснование.* Для организации биотехнологической лаборатории необходимы просторные изолированные помещения, а также современное оборудование и высококачественные реактивы. Для удобства проведения дезинфекции полы, стены и потолок в помещениях должны иметь водостойкое и ультрафиолетостойкое покрытие.

Оборудование моечного помещения: мойки с горячей и холодной водой; дистиллированная вода; дистилляторы и бидистилляторы; сушильные шкафы с режимом работы для сушки посуды – до 100-130 °С, для инструментов – до 170 °С; шкафы для хранения чистой посуды и инструментов, емкости для хранения моющих средств, вытяжные шкафы с эксикаторами для хромпика ( $H_2SO_4$  98 % +  $K_2CrO_7$ ).

*Оборудование помещения для приготовления питательных сред:* лабораторные столы; холодильники для хранения маточных растворов солей, гормонов и витаминов; аналитические и торсионные весы; иономер; магнитные мешалки; плитки, газовые горелки; набор посуды (колбы, стаканы, мерные цилиндры, мензурки, пробирки и др.), необходимый набор химических реактивов надлежащей степени чистоты (ХЧ, Ч, ЧДА).

Оборудование помещения для стерилизации: автоклавы с режимом работы – давление 1-2 атмосферы и температура 120 °С; стеллажи для штативов с питательными средами; шкафы для хранения стерильных материалов. Данное помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и иметь канализационный слив для отвода конденсата из автоклава.

*Оборудование помещения для инокуляции растительных эксплантов на питательные среды:* ламинар-боксы, лабораторные столы, стеллажи, бактерицидные лампы, шкафы для материалов и оборудования.

Оборудование культуральных помещений: световое отделение – источники освещения со спектром близким к спектру дневного света (от 3 до 10 лк),

кондиционер для регуляции температуры ( $25 \pm 2$  °C) и влажности воздуха (70 %), стеллажи для штативов с культивируемым материалом; темновое отделение – с тем же оборудованием, исключая источники освещения.

*Особенности работы в условиях стерильной лаборатории.*

При работе в стерильном помещении лаборатории все сотрудники биотехнологической лаборатории и студенты обязаны соблюдать следующие правила работы, которые обеспечивают стерильность в работе и предупреждают возможность возникновения заражений внутри лабораторных помещений:

- 1) находящиеся в лаборатории сотрудники и студенты, должны быть в халатах, сменной обуви (либо бахилах), белой шапочке или косынке;
- 2) в помещении запрещается прием пищи и курение, хранение продуктов питания;
- 3) нельзя вносить в лабораторию посторонние вещи;
- 4) запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнее платье на халат;
- 5) каждый работник должен пользоваться только своим рабочим местом;
- 6) все операции должны производиться с соблюдением правил стерильности: все стерильные работы проводят вблизи пламени горелки, переливание зараженных жидкостей производят над лотком с дезинфицирующим раствором;
- 7) нужно строго следить за чистотой рук: по окончании работы с заразным материалом их дезинфицируют. Рабочее место в конце дня приводят в порядок и тщательно дезинфицируют.
- 8) весь инвентарь, находившийся в контакте с заразным материалом, подлежит стерилизации или уничтожению.

Биотехнологическую лабораторию необходимо содержать в чистоте. Следует регулярно проводить гигиеническую уборку помещений лаборатории. Обеспечить полную стерильность лаборатории очень трудно и это не всегда необходимо, но значительно снизить количество микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях в лабораторных помещениях возможно. Это достигается путём применения на практике методов дезинфекции, то есть уничтожения возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды.

Для культивирования стерильных проростков необходимо использовать ламинар-боксы, что обеспечивает посадку эксплантов на питательную среду без заражения микроорганизмами.

Все поверхности ламинар-боксов обрабатываются 96 % спиртом, простерилизованные инструменты, материалы, растительный материал помещают на стол ламинар-боксов и включают УФ-излучение. Через 20 минут выключают УФ и включают биофильтры. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный халат и шапочку, руки обрабатывают 96 % спиртом. Пинцеты, скальпели и препарировальные иглы помещают в стакан с 96 % спиртом. Перед каждой манипуляцией инструменты обжигают на пламени спиртовки. В случае нарушения стерильности на средах

хорошо развиваются микроорганизмы (грибы, бактерии), нарушающие состав среды и подавляющие рост растительных эксплантов.

Посуду, халаты, вату, бумагу, дистиллированную воду, питательные среды стерилизуют в автоклавах под давлением пара 1-2 атмосферы и температурой 120 °С в течение 20-60 мин, в зависимости от объёма стерилизуемого материала.

Колбы, штативы со средой, вату, бумагу, халаты перед автоклавированием заворачивают в целлофановую бумагу, либо помещают в биксы.

Металлические инструменты автоклавировать нельзя, так как под действием пара образуется ржавчина. Поэтому их стерилизуют сухим жаром в термостатах с температурой 170-250 °С в течение 1-2 часов.

*Задание 1.* Прочитайте инструктаж по технике безопасности при работе в лаборатории биотехнологии, ответьте на контрольные вопросы.

Дайте ответы на следующие вопросы:

1. Можно ли сливать необеззараженные жидкости в канализационный слив? Ответ обоснуйте.
2. Перечислите порядок действий при попадании на кожу концентрированной кислоты.
3. Перечислите все средства индивидуальной защиты (СИЗ), необходимые при работе в лаборатории биотехнологии.
4. Укажите правильный порядок, ответ обоснуйте:
  - а) приливают кислоту в воду; б) воду в кислоту; в) нет разницы.
5. При нагревании жидкость в пробирке должна занимать:
  - а) 1/2 объема; б) 1/3 объема; в) допустим любой объем жидкости.
6. При возникновении аварийной ситуации:
  - а) устранять ее последствия самостоятельно, если авария небольшая;
  - б) сообщать только об авариях на своем рабочем столе;
  - в) о любых авариях сообщать преподавателю или старшему лаборанту;
  - г) не обращать внимания на аварию и продолжать работу.

*Материалы и оборудование:* химические стаканы (50, 100, 250 мл), штативы с пробирками, инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы, препарировальные иглы), моющие средства, (стиральный порошок), хромпик, гипохлорит натрия.

*Ход работы:*

1. Ознакомиться с устройством биотехнологической лаборатории.
2. Под руководством преподавателя освоить принципы работы автоклава, сушильного шкафа, дистиллятора и другого вспомогательного оборудования.
3. Посуду замочить в растворе гипохлорита натрия, тщательно отмыть в растворах детергентов (стиральный порошок), промыть 8-10 раз проточной водой, поместить на 4-6 часов в хромпик (смесь серной кислоты с бихроматом калия), промыть теплой водой, затем дважды дистиллированной.

4. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 2 часа при температуре 100-130 °С.

5. Сухую посуду для хранения закрыть ватными пробками, фольгой, целлофаном.

*Задание 2.* Основные направления современной биотехнологии. Просмотрите фильм «Можно ли жить вечно?». Запишите биологические технологии, показанные в фильме, и их существующие прототипы.

Цель: получить представления о науке биотехнологии.

Домашнее задание: подготовьте реферативное сообщение и 10-минутный доклад с презентацией на следующие темы:

- Основы промышленного пивоварения/виноделия.
- Промышленное производство рекомбинантного инсулина/ антибиотиков.
- Промышленное получение аминокислот на основе иммобилизованных ферментов/ Получение микробных препаратов - удобрений, стимуляторов и регуляторов роста растений.
- Получение микробных биопластиков / Добыча золота с помощью бактерий.
- Принципы получения биотоплива из микроорганизмов/растений: реалии и перспективы.

Правила оформления реферативного сообщения, план доклада и критерии оценки представлены в приложениях 1, 2.

*Контрольные вопросы:*

1. Как устроена биотехнологическая лаборатория?
2. Как простерилизовать питательные среды, посуду, дистиллированную воду, инструменты?
3. Как происходит стерилизация помещения лаборатории?

## Практическая работа № 2

### Биотехнология промышленных производств

*Цель:* получить представления об особенностях некоторых биотехнологических. промышленных производств.

*Задачи.*

- I. Прослушать доклады на следующие темы:
  - Основы промышленного пивоварения/ виноделия.
  - Промышленное производство рекомбинантного инсулина/ антибиотиков.
  - Промышленное получение аминокислот на основе иммобилизованных ферментов / Получение микробных препаратов - удобрений, стимуляторов и регуляторов роста растений.
    - Получение микробных биопластиков / Добыча золота с помощью бактерий.
    - Принципы получения биотоплива из микроорганизмов/растений: реалии и перспективы.
2. Выполнить задания к практической работе.

*Задание 1.* Дайте ответы на следующие вопросы по темам докладов:

1. Как происходит селекция штаммов-продуцентов в промышленном пивоварении/виноделии? Какие биологические объекты используются?
2. Какие субстраты используются при промышленном получении инсулина/антибиотиков?
3. Перечислите основные этапы технологического процесса получения аминокислот на основе иммобилизованных ферментов / препаратов удобрений.
4. В каких сферах деятельности применяются микробные биопластики / золото в ионной форме?
5. Каковы перспективы получения биотоплива из микроорганизмов/растений?

## Лабораторная работа № 3

### Методы стерилизации растительного материала, питательных сред

*Цель работы:* освоить методы стерилизации помещений, растительного материала, посуды, инструментов и питательных сред.

*Теоретическое обоснование.* Одно из основных условий успешного культивирования изолированных органов, тканей, клеток и протопластов состоит в соблюдении строгой стерильности. Тщательная стерилизация необходима, так как на искусственных питательных средах, предназначенных для культивирования растительных тканей и клеток, хорошо развиваются и микроорганизмы, что создает опасность для культивируемого материала. В результате жизнедеятельности организмов изменяется состав питательных сред. Кроме того, изолированные от растения ткани, клетки и особенно протопласты легко повреждаются микроорганизмами. Поэтому все опыты с культурой изолированных органов, тканей, клеток и протопластов растений проводят в ламинар-боксах. Стерилизуют бокс, инструменты, посуду, растительный материал, питательные среды, ватные пробки и все другие материалы, необходимые для работы.

*Материал и оборудование:* семена, клубни, побеги и стебли растений. Стаканы химические на 500-700 мл, колба с дистиллированной водой на 1 л, чашки Петри, предметные стекла, скальпель, пинцет, игла, марлевые мешочки, стерилизаторы, пробирки, чашки с питательными средами, фильтры Зейца или «Миллипор» для холодной стерилизации. Автоклав, сушильный шкаф.

*Ход работы:*

*Ламинар-бокс:* протирают внутреннюю рабочую поверхность 70 % спиртом. Затем размещают в ламинар-боксе спиртовую горелку, спички, стакан с 96 % спиртом, стерильную посуду и инструменты, колбу со стерильной водой. При проведении работ по вычленению меристем в ламинар-бокс ставят бинокулярную лупу. Ламинар-бокс облучают бактерицидными ультрафиолетовыми лампами в течение 10-12 ч.

*Посуда:* Стерилизация проводится в сушильном шкафу или в автоклаве. Перед стерилизацией посуду надо вымыть и высушить. Для мытья посуды используют детергенты, а также раствор двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпик). Перед стерилизацией пробирки, колбы предварительно закрывают ватными пробками, заворачивают в оберточную бумагу. Затем посуду помещают в сушильный шкаф и нагревают при температуре +175 °С в течение 2 ч (после того как установится нужная температура). При таком нагревании погибают не только бактерии, но и их споры. Температуру в сушильном шкафу выше 175 °С допускать не следует, так как при этом ватные пробки буреют, а бумага, которой закрывают ватную пробку сверху, становится ломкой.

Еще более строгой стерилизации можно добиться под давлением в автоклаве, так как влажный жар эффективнее убивает микроорганизмы и их споры, чем сухой. *Автоклавированию* подвергают стаканы с крышками, чашки Петри, пипетки, колбы с дистиллированной водой. Посуду заворачивают в фольгу или оберточную бумагу и автоклавируют при 2 атм. в течение 25-30 минут. Верхнюю часть градуированных пипеток закрывают ватной прокладкой, пипетки заворачивают в бумагу по 10 штук.

*Инструменты.* Предварительную стерилизацию инструментов скальпелей, пинцетов, игл и т.д. проводят нагреванием сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 12 ч при 140 °С. Кипячением удобно стерилизовать шприцы. Металлические предметы нельзя стерилизовать автоклавированием, так как под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в процессе посадки инструменты стерилизуют дополнительно, помещая в фарфоровый стакан с 96 % этиловым спиртом и обжигая в пламени спиртовки. Обжигать можно ланцеты, пинцеты, микробиологические петли. После стерилизации обжиганием каждый инструмент помещают между листами предварительно простерилизованной плотной бумаги, сложенными в пачку или в специальный штатив. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Затем его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь. Очень тонкие инструменты (иглы, кусочки лезвий) могут терять свои свойства при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт.

*Материалы:* вату, марлю, ватные пробки, фильтровальную бумагу, халаты, косынки, которые могут использоваться при посадке тканей, стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм. в течение 25-30 мин.

*Растительный материал.* Для стерилизации семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют различные стерилизующие растворы: водные растворы сулемы, или двухлористой ртути (0,1 %), брома (1 %), пергидроля (20-30 %), хлорамина (3-6 %), диацида, гипохлорита натрия (10 %).

Диацид готовят следующим образом: растворяют отдельно 330 мг этанолртутихлорида (хлорид этилртути – металлоорганическое соединение ртути  $C_2H_5HgCl$ ) и 660 мг цетилпиридинилхлорида ( $C_{21}H_{38}ClN$  антисептик) в горячей воде (около 300 мл), смешивают полученные растворы, доводят объем жидкости дистиллированной водой до 1 л и добавляют несколько капель детергента Твин-80 (полисорбат-80 – поверхностно-активное вещество). Диацид хранят в холодильнике в плотно закрытой колбе в темноте.

Прежде чем приступить к стерилизации растительной ткани, ее предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, снимают кожуру (у корней и клубнеплодов), кору (у побегов), промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд в 96 % спирт. При этом кроме действия спирта отмечается усиление эффекта основного стерилизующего раствора. После стерилизации



растительные объекты следует тщательно отмыть от стерилизующих веществ, многократно последовательно ополаскивая дистиллированной водой.

Диацид рекомендуется использовать при стерилизации семян кукурузы, пшеницы, ржи; пергидроль для фасоли, люпина, подсолнечника (с очищенной кожурой), томатов, редиса и др. Время стерилизации семян диацидом 15-20 мин, пергидролем 10 мин. Некоторые семена (хлопчатник, горох) хорошо стерилизуются концентрированной серной кислотой в течение 3 мин, с последующей пятикратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой. Время стерилизации меристем и кусочков тканей из разных частей растения примерно вдвое меньше. Обычно используют диацид, который затем отмывают водой, воду меняют 5-6 раз.

Иногда семена некоторых растений (томат, яблоня, тыква, бобы, табак), не обрабатывают антисептиком. Ко времени созревания семена оказываются заключенными в мясистые, деревянистые или костяковидные покровы. Здоровые с неповрежденной поверхностью плоды этих культур тщательно промывают мыльной водой, затем несколько раз спиртом. После этого в строго асептических условиях их разламывают. Стерильным инструментом из разлома выбирают семена и помещают их в стерильную посуду.

*Питательные среды.* Колбы и пробирки с питательными средами закрывают ватными пробками, заворачивают горлышко в целлофан или оберточную бумагу и автоклавировать при температуре 120 °С и давлении 1 атм. в течение 20 мин.

Холодная стерилизация. Органические жидкости, которые не выносят нагревания, освобождают от бактерий при пропускании через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

*Контрольные вопросы*

1. Что такое стерильность?
2. Какими способами стерилизуют посуду, инструменты?
3. Какими способами стерилизуют растительные объекты?
4. Как стерилизуют питательные среды?
5. При каком нагревании погибают не только бактерии, но и их споры?

## Лабораторная работа № 4

### Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей на примере среды Мурасиге-Скуга

*Цель работы:* освоить приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей на примере среды Мурасиге-Скуга.

*Теоретическое обоснование.* Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы, витамины, углеводы, фитогормоны. Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина, определенные аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, повышающие доступность железа для клеток в широких пределах рН.

В зависимости от вида растений необходимо испытывать как твердые (агаризованные), так и жидкие питательные среды. Иногда жидкие среды имеют преимущество, так как обеспечивают большую подвижность трофических элементов. Например, при размножении роз более успешным было культивирование побегов на двухслойной питательной среде: нижний слой – агаризованный, верхний – жидкий. На эффективность размножения могут также влиять расположение экспланта (горизонтальное или вертикальное), тип пробок (ватные, пластмассовые, стеклянные, металлические и т.д.), а также соотношение объема эксплантов и количества питательной среды для оптимального освещения и газообмена эксплантов.

Состав питательной среды необходимо подбирать для каждого вида растений. На микрклональное размножение влияют гормоны, минеральные соли, витамины и углеводы. При размножении *in vitro* используют среды Мурасиге и Скуга, Гамборга, Хеллера и другие.

Обычно используют среду Мурасиге–Скуга (MS), которая содержит много неорганического азота, что стимулирует процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза. Вопрос оптимального соотношения  $\text{NH}_4$  -  $\text{NO}_3$  остается открытым, так как литературные данные противоречивы и универсального рецепта для всех видов растений нет. В качестве источника углеродного питания используют различные углеводы типа сахарозы, глюкозы, фруктозы, галактозы.

Разные культуры требуют различной концентрации углеводов на разных этапах микрклонального размножения. Углеводы выступают необходимым компонентом питательных сред при культивировании изолированных клеток и тканей, так как они не способны к автотрофному питанию. Обычно в качестве источника углеводов используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 20-40 г/л. Опухолевые ткани, в которых много активных гидролитических ферментов, могут расти на средах с растворенным крахмалом.

Компоненты среды для выращивания растительных клеток и тканей можно разделить на 6 основных групп, что обычно отражает порядок приготовления концентрированных маточных растворов: макроэлементы, микроэлементы, источники железа, витамины, источники углерода, фитогормоны (табл. 1).

Таблица 1

Состав питательных сред, мг/л

Компонент	Состав питательных сред, мг/л				
	Knudson C	Murashige & Skoog	Harvais I A	Van Waes & Deberg	
				BM 1	BM 2
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	1000		400		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500				
KNO <sub>3</sub>		1900	200		
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O		440			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		1650	400		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250	170	200	240	240
KCl			100		
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	250	370	200	100	100
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	25	27,95		27,95	27,95
Na <sub>2</sub> ЭДТА		37,23		37,23	37,23
Хелат железа			5 мл		
CoCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O		0,025	0,02		
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O		8,6	0,5	10	10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		6,2	0,5	10	to
MgSO <sub>4</sub> *4 H <sub>2</sub> O	7,5	22,3	0,5	25	25
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O		0,025	0,5	0,025	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O		0,25	0,04	0,25	0,25
KJ		0,83	0,1		
Глицин		2		2	2
Мезоинозит		100		1200	1200
Никотиновая кислота		0,5	5	5	5
Тиамин		0,1	5	0,5	0,5
Пиридоксин		0,5	0,5	0,5	0,5
Фолиевая кислота				0,5	0,5
Биотин				0,05	0,05
Гидролизат казеина				500	500
L -глутамин				100	100
6-БАП					0,2
Сахароза	20000	30000		20000	20000
Картофельный экстракт			100 мл		
Агар-агар	17500	10000	10000	6000	6000
pH среды	4,8-5,2	5,7	6,0-6,4	5,8	5,8

Основой для всех питательных сред для культивирования растительных эксплантов является смесь минеральных солей. Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора – в виде фосфатов; серы – в виде сульфатов; а также растворимых солей K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>. Железо используется в виде хелатов [FeO<sub>4</sub> или Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или её

натриевая соль Na ЭДТА (трилон Б)] – наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями.

Азот, фосфор, сера входят в состав органических соединений: белков, жиров, нуклеиновых кислот. Железо, цинк, марганец, молибден, кобальт в сочетании с порфиринами образуют макромолекулы пигментов фотосинтеза (хлорофилла), окислительно-восстановительных ферментов (каталазы, пероксидазы, полифенолоксидазы). Следовательно, все эти соединения выполняют в клетках и тканях структурную функцию. В то же время ионы  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Cl^-$ ,  $H^+$  необходимы для регуляции рН среды и поддержания физиологических градиентов клеток (тургора, осмотического давления, полярности).

В качестве источника углерода для биологических макромолекул, а также при культивировании гетеротрофных тканей (калусов и суспензий) в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 20-60 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза), моносахариды (гексозы: глюкоза и фруктоза, пентозы: ксилоза и другие). Полисахариды в питательных средах практически не используются. Только некоторые типы тканей (опухольевые), содержащие гидролитические ферменты, выращивают на средах с крахмалом, рафинозой, целлобиозой.

Для стимуляции биохимических реакций в клетке используют биологические катализаторы: витамины группы В ( $B_1$ ,  $B_6$ ,  $B_{12}$ ), С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит.

Тиамин ( $B_1$ ) входит в состав пируватдекарбоксилазы, участвует в превращениях углеводов. Тиаминпирофосфат входит в состав ферментов окислительного декарбоксилирования кетокислот (пировиноградной и кетоглутаровой), является коферментом транскетолазы.

Пиридоксин ( $B_6$ ) в виде фосфорнокислого эфира входит в состав ферментов декарбоксилирования и переаминирования аминокислот.

Никотиновая кислота (РР) в виде амида входит в состав дегидрогеназ НАД и НАДФ, катализирующих донорно-акцепторную цепь  $H^+$  (отнятие  $H^+$  от молекул органических веществ). Для управления процессами формообразования в культуре тканей необходимы биологические регуляторы роста и развития – фитогормоны. Эти вещества влияют на дифференциацию и дедифференциацию клеток и тканей, инициируют гистогенез, индуцируют деление и растяжение клеток, участвуют в процессах старения и созревания, либо стимулируют, либо ингибируют рост и развитие клеточных культур, обуславливают формирование пола, роста изолированных тканей и индукции органогенеза, чем кинетин. В состав некоторых питательных смесей входит аденин. В биотехнологических исследованиях чаще используют гормоны, стимулирующие рост и развитие: ауксины, цитокинины, гиббереллины.

Регуляторы роста необходимы для дифференцировки клеток и для индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны входить ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и

цитокинины, индуцирующие деление дедифференцированных клеток. В случае индукции стеблевого морфогенеза можно снизить содержание ауксинов в среде или исключить их из питательной среды. На средах без гормонов растут опухолевые и «привыкшие» к таким условиям ткани. Автономность по отношению к гормонам того и другого типа или к одному из них связана со способностью клеток синтезировать гормоны.

*Ауксины.* В качестве источников ауксинов в питательных средах обычно используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д)- 1-10 мг/л, индолилуксусную кислоту (ИУК) – 1-30 мг/л и нафтилуксусную кислоту (НУК) – 0,1-2 мг/л. ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д. Для индукции образования каллуса применяют высокие концентрации ауксинов, а при последующих пересадках ткань может расти, если содержание ауксинов в среде уменьшено в несколько раз.

*Цитокинины.* В качестве источника цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопуридин (6-БАП), зеатин (0,001-10 мг/л). Зеатин и БАП более активны в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза, чем кинетин. В состав некоторых питательных смесей входит аденин.

*Гиббереллины:* гибберелловая кислота. В отдельные питательные среды включают кроме ауксинов и цитокининов гибберелловую кислоту (ГК). Иногда к питательной среде добавляют растительные экстракты или соки. Наибольшей активирующей рост способностью обладает кокосовое молоко-жидкий эндосперм кокосового ореха.

В качестве биологических добавок для индукции первичного каллуса можно использовать растительные экстракты (10-15 % от общего объёма среды): кокосовое молоко, вытяжки из незрелых зерновок кукурузы (лучше в период молочной спелости), которые содержат цитокинины – кинетин и зеатин (6-ти замещенные аминопурины) и NN-дифенилмочевину.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар - полисахарид, получаемый из морских водорослей. Обычно для получения твердой питательной смеси к среде добавляют 5-8 % агар-агара.

В культуре *in vitro* применяют жидкие и агаризованные (твердые) среды. Жидкие среды используются для культивирования суспензий, каллусов, изолированных органов и тканей, растений-регенерантов. Агаризованные среды готовят на основе агар-агара, который образует с водой гель при pH 5,6-6,0. Иногда в качестве уплотнителя и заменителя агар-агара используют полиакриламидные гели (биогели) P<sub>10</sub> и P<sub>200</sub>.

Для искусственных питательных сред растворы макро - и микросолей готовят заранее и используют многократно. Это маточные (концентрированные) растворы. Макро - и микросоли хранят в специальных условиях: в холодильнике в сосудах с притертыми пробками при 0...+4 °С; витамины, фитогормоны, ферменты, растительные экстракты – при -20 °С в небольших по 5-10 мл сосудах с пробками (пеницилловые флаконы).

Маточные растворы макросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 10-40 раз, микросолей – в 100-1000 раз, витаминов – в 1000 раз.

Растворы фитогормонов желательно готовить непосредственно перед работой со средами.

Для приготовления маточного раствора макро - и микросолей каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, затем сливают и доводят до нужного объема. В охлажденную смесь микросолей последним добавляют раствор солей молибдена, а в макросоли – раствор солей магния (для предотвращения выпадения осадка).

Маточные растворы хлористого кальция и хелата железа (сернокислое железо + ЭДТА, либо Na ЭДТА – трилон Б) готовят и хранят отдельно от других солей.

Концентрированные растворы витаминов готовят следующим образом: 10-кратные навески растворяют в 10 мл дистиллированной воды каждый отдельно.

*Фитогормоны* – это вещества, которые плохо растворяются в воде. Поэтому предварительно 100 мг вещества растворяют в небольших количествах (0,5-2,0 мл) спирта (ауксины, гиббереллины), 1 н HCl или KOH (цитокнины), затем подогревают до полного растворения (кроме абсцизовой кислоты и кинетина) и доводят до 100 мл объема (1 мл содержит 1 мг вещества).

*Материалы и оборудование:* пробирки диаметром 15-25 мм, пипетки стеклянные объемом 1-25 мл, мерные цилиндры объемом 25-1000 мл, мерные стаканы на 50-1000 мл, химические стаканы, автоматические пипетки, весы аналитические, электроплитка, водяная баня, магнитная мешалка, фарфоровые стаканы объемом 200-500 мл, конические колбы на 250-500 мл, чашки Петри диаметром 40-90 мм, предметные стекла, скальпель, пинцет, тонкая фольга, пергаментная бумага, соли, фитогормоны, витамины, этиловый спирт, 1 н раствор NaOH или KOH, автоклав, сушильный шкаф, моющие средства.

*Ход работы:*

Посуду тщательно вымыть в растворах детергентов (стиральный порошок, мыльная вода).

Отмыть посуду от детергентов в 8-10 порциях проточной воды.

Поместить на 1-6 часов в хромпик, в 10 повторностях промыть теплой водопроводной водой, затем 5 раз всполоснуть дистиллированной водой.

Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 2 часа при температуре 130-170 °С.

Металлические инструменты завернуть в плотную бумагу и поместить в сушильный шкаф для стерилизации сухим жаром при температуре 170-200 °С в течение 2 часов.

Сухую посуду, инструменты обернуть бумагой или целлофаном и хранить в стеклянных шкафах или в выдвижных полках лабораторных столов.

Приготовить маточный раствор микроэлементов согласно прописи. Для этого взять 100 кратную навеску каждой соли, растворить при слабом нагревании в

небольшом объеме дистиллированной воды, охладить до комнатной температуры, слить растворы в мерный цилиндр и довести дистиллированной водой до 200 мл. На 1 л среды брать 2 мл маточного раствора.

Приготовить маточный раствор хелата железа.

*Приготовление 20 кратного концентрата хелата железа (Fe-хелата):*

557 мг  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и 745 мг  $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  растворяют по отдельности при нагревании (не доводя до кипения) в 30-40 мл дистиллированной воды. Затем растворы объединяют и доводят до общего объема -100 мл. На 1 л среды брать 5 мл раствора.

Приготовить концентрированные растворы ауксинов. Для этого 100 мг вещества (ИУК, 2,4-Д, НУК) растворить в 1,2 мл этилового спирта (каждый в отдельности), подогреть, довести дистиллированной водой до 100 мл, 1 мл раствора будет содержать 1 мг вещества.

Приготовить концентрированные растворы цитокининов. Для этого 100 мг вещества (кинетин, зеатин, БАП) растворить в небольшом объеме 1 н раствора NaOH (КОН) при слабом нагревании, довести дистиллированной водой до 100 мл, 1 мл раствора будет содержать 1 мг вещества.

Приготовить маточные растворы витаминов. Для этого ампулу (аптечную) содержащую (1 или 5 %) раствора витамина довести до 100 мл дистиллированной водой, 1 мл раствора будет содержать соответственно 0,1 или 0,5 мг витамина.

На сосудах с маточными растворами обязательно указать название среды, концентрацию раствора. Дату приготовления и поместить в холодильник. Хранить при температуре 4-7 °С в течение месяца.

Для приготовления 1 л среды в стакан объемом 1 л, пипеткой перенести необходимый объем каждого из исходных растворов.

Растворить в небольших объемах дистиллированной воды (каждый в отдельности) мезоинозит, глицин, сахарозу и полученные растворы внести в стакан с маточными растворами.

Полученную жидкую питательную среду из стакана слить в мерный цилиндр и дистиллированной водой довести до объема 950 мл.

Довести pH среды до требуемого значения. Если pH выше нужного значения добавить несколько капель 1 н HCl, если ниже этого значения – добавить несколько капель 1 н NaOH (КОН) в мерный цилиндр, тщательно перемешать. Отлить небольшой объем среды в стакан, измерить pH. Измерения pH среды проводить до установления требуемой величины.

Навеску пластинчатого агар-агара (6-7 г) поместить в стакан со средой, растворить, нагревая на плите (*не доводя до кипения*), при постоянном помешивании.

Питательную среду нагреть до 50-60 °С, объединить с горячим раствором агар-агара. Порошкообразный агар-агар можно внести в среду непосредственно.

Довести объем среды до метки 1 л подогретой дистиллированной водой и тщательно перемешать.



Готовую питательную среду разлить на  $\frac{1}{4}$  объема в пробирки, закрыть пробирки колпачками из ваты или фольгой, поместить пробирки в металлические штативы.

Поместить штативы в автоклав и автоклавируют в течение 15 мин при давлении 0,7-1 атм.

*Контрольные вопросы*

1. Каков состав питательных сред для изолированных клеток и тканей?
2. Какие вещества используют в качестве ауксинов в питательных средах?
3. Что такое маточные растворы и как их готовят?
4. Как приготовить маточные растворы витаминов?
5. Как приготовить маточные растворы макро - и микросолей?
6. Какая информация указывается на сосудах с маточными растворами?

## Лабораторная работа № 5

### Приготовление и методы оценки качества питательных сред

*Цель работы.* познакомиться с методами приготовления и контроля качества питательных сред.

*Задачи.*

1. Изучить требования, предъявляемые к питательным средам.
2. Получить представление о физико-химических методах оценки качества питательных сред.
3. Познакомится с методами биологического контроля качества сред.
4. Освоить стадии приготовления мясопептонного бульона (МПБ) и метод определения концентрации аминного азота в питательных средах и полуфабрикатах.
5. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование. Основные сведения о питательных средах.* Различные питательные среды используют для выделения, выращивания и длительного сохранения микроорганизмов в культурах.

Требования, предъявляемые к питательным средам:

1. Питательные среды должны содержать в легкоусвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей микроорганизмов. Ими являются источники органических и минеральных (неорганических) веществ, включая микроэлементы. При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят факторы роста - витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать.

2. Питательные среды должны иметь оптимальную концентрацию водородных ионов - рН, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества. Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать буферностью, то есть содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена.

3. Должны быть изотоничными для микробной клетки, то есть осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5 % раствору натрия хлорида.

4. Должны быть стерильными, так как посторонние микроорганизмы препятствуют росту изучаемого микроорганизма, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, рН и др.).

5. Должны быть по возможности унифицированным, то есть содержать постоянные количества отдельных ингредиентов.

6. Желательно, чтобы среды были прозрачными удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

*Задание 1.* Напишите классификацию питательных сред, приведите примеры питательных сред:

- а) по физическому состоянию;
- б) по составу.

*Методы оценки качества питательных сред.*

Качество бактериологических питательных сред (основ, добавок) - это совокупность свойств продукции, обуславливающих ее способность удовлетворять определенным требованиям в соответствии с назначением.

Оценка качества питательных сред и их компонентов проводится с помощью совокупности показателей, выбираемых для контроля среды в соответствии с ее назначением, и включает:

- 1) контроль качества препарата по физико-химическим показателям;
- 2) контроль специфической активности препарата по биологическим показателям.

*Задание 2.* Изложите проведение контроля качества питательных сред:

- а) по биологическим показателям;
- б) по физико-химическим показателям.

*Задание 3.* Приготовьте питательную среду МПБ.

Материалы и оборудование: электроплитка, мясо, пептон, NaCl, марля, бумажный фильтр, термостойкие колбы и стаканы, химические пробирки, флакон на 200 мл.

*Ход работы:*

1. Прокипятить мясо в течение 15 мин на электроплитке.
2. Во время кипячения приготовить навески: 50 мг пептона и 10 мг NaCl.
3. Полученный отвар остудить и процедить в термостойкий стакан через 2-3 слоя марли.
4. В процеженный отвар при подогревании и помешивании добавить 50 мг пептона и 10 мг NaCl, дождаться полного растворения пептона.
5. Профильтровать отвар в горячем состоянии через двойной бумажный фильтр.
6. Проверить pH среды с использованием pH-метра.
7. Налить 2 мл полученного мясопептонного бульона в химическую пробирку, провести определение содержания аминного азота.
8. Остальной бульон перелить во флакон на 100 мл, и стерилизовать.
9. Сделать заключение по работе. Рассчитать концентрацию (в %) NaCl в питательной среде.

*Задание 4. Оцените концентрацию аминного азота в среде МПБ методом формального титрования (метод Сёренсена).*

*Материалы и оборудование:* среда МПБ, 1,5 н NaOH, 40 % раствор формальдегида, фенолфталеин, химические пробирки, градуированные пробирки.

Концентрация аминного азота - важная характеристика питательных сред, так как показывает количество азота, которое доступно для усвоения бактериями. Аминный азот (NH<sub>2</sub>) - это суммарный азот аминогрупп аминокислот и низших полипептидов. В среде для культивирования большинства микроорганизмов должно содержаться не менее 0,8-1,2 г/л аминного азота.

Определение содержания аминного азота в питательных средах проводят методом формального титрования. Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при pH 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп.

*Ход работы.*

1. В первую пробирку налить 2 мл исследуемой среды (МПБ), во вторую - 2 мл 40 % формальдегида.
2. В каждую пробирку добавить 2-3 капли фенолфталеина.
3. Для нейтрализации растворов до pH 7,0 (формальдегид) и 9,0 (МПБ) титровать каждый раствор 1,5 н NaOH до появления слабо-розового окрашивания (записать количество потраченного NaOH).
4. Соединить исследуемую среду с раствором 40 % формальдегида.
5. Если после соединения жидкостей произошло обесцвечивание раствора, продолжить титровать смесь 1,5 н NaOH до появления слабо-розового окрашивания (записать количество потраченного NaOH).
6. Сложить значения количества NaOH, пошедшего на титрование МПБ, формальдегида и смеси веществ.
7. Рассчитать количество аминного азота по формуле

$$X = (a \cdot 100 \cdot 2,8) / 2,$$

где а - общее количество NaOH, используемого на нейтрализацию всех карбоксильных групп; 100 - коэффициент пересчета на 1 литр среды; 2,8 - корректирующий коэффициент (из расчета: 1 мл 1,5 н NaOH равен 1,4 мг аминного азота); 2 - 2 мл исходного раствора; X- количество граммов аминного азота в 1 литре среды.

8. Сделать заключение о качестве исследуемой среды (пригодна ли для выращивания микроорганизмов), написать уравнения реакции блокирования щелочью свободных аминогрупп.

## Лабораторная работа № 6

### Подготовка растительного материала и изоляция эксплантов стерильных проростков бобовых и злаковых культур

*Цель работы:* овладеть подготовкой растительного материала и изоляцией эксплантов стерильных проростков бобовых и злаковых культур.

*Теоретическое обоснование.* Стерильные проростки выращивают с целью получения асептических растений и получения эксплантов *in vitro*. В зависимости от задачи опыта семена высевают на воду или агаризованную питательную среду.

Существуют три возможных пути использования стерильных проростков:

- 1) для получения эксплантов из дифференцированных тканей, которые при переносе на питательную среду, содержащую фитогормоны, дифференцируются и в результате интенсивной пролиферации образуют каллусную ткань;
- 2) для получения каллуса непосредственно на проростках;
- 3) для получения протопластов из частей проростка, обычно из листьев, иногда из корней.

Для образования каллуса на проростках необходимы фитогормоны, поэтому в состав питательной среды для выращивания входит 2,4-Д.

*Материалы и оборудование:* зерновка пшеницы и ячменя; 6 % раствор хлорамина, 70 % раствор этилового спирта, 0,1 % раствор сулемы, стерильная дистиллированная вода.

Стерильные чашки Петри, стерильные химические стаканы, пробирки, пинцет, фильтровальная бумага, спиртовка, ламинар-бокс, термостат.

*Ход работы:*

Отобрать неповрежденные зерновки пшеницы или ячменя. В ламинар-боксе поместить по 15 семян в 5 чашек Петри (на каждый вариант) со следующими веществами:

- вариант I – 6 % раствор хлорамина;
- вариант II – 6 % раствор гипохлорита кальция;
- вариант III – 70 % раствор этилового спирта;
- вариант IV – 0,1 % раствор сулемы;
- вариант V – стерильная дистиллированная вода (контроль).

Отметить продолжительность стерилизации. Отмыть зерновки от стерилизирующих растворов в 3-х порциях дистиллированной стерильной воды.

Поместить зерновки для проращивания в стерильные чашки Петри со стерильной фильтровальной бумагой, смоченной дистиллированной водой. Чашки Петри закрыть и перенести в термостат. Зерновки проращивать при температуре 20-25 °С в темноте.

Через 4-6 дней определить степень зараженности. Сделать выводы об эффективности стерилизирующих растворов.

*Контрольные вопросы*

1. С какой целью выращивают стерильные проростки?
2. Каковы возможные пути использования стерильных проростков?
3. Какие среды используют для выращивания стерильных проростков?
4. Что такое дифференцированные ткани?
5. Какие растворы используются для стерилизации проростков?

## Лабораторная работа № 7

### Микроклональное размножение растений и получение оздоровленного посадочного материала

*Цель работы.* освоить микроклональное размножение растений и получение оздоровленного посадочного материала.

*Теоретическое обоснование.* Микроклональное размножение – это массовое бесполое размножение в культуре *in vitro*, при котором получаемые растения генетически идентичны исходной родительской форме. От традиционных методов вегетативного размножения растений оно отличается рядом преимуществ:

- получение большого числа копий из минимального количества исходного материала;
- возможность отбирать *in vitro* растительный материал с полезными признаками;
- возможностью получения оздоровленного (безвирусного) посадочного материала;
- возможностью вести размножение растений на протяжении всего года, вне зависимости от сезона;
- возможностью размножить растения, которые с трудом или вовсе не размножаются вегетативно, например, пальмы;
- получением, в зависимости от целей исследования как генетически однородного материала, так и соматоклональных вариантов.

Весь процесс микроклонального размножения можно разделить на три стадии:

- индукция множественных побегов при повторных пассированиях на среде для размножения;
- подготовка сформировавшихся *in vitro* растений к переносу в открытый грунт.
- в целом метод микроклонального размножения основан на индуцированном фитогормонами разрастании верхушечных и пазушных меристем, каждая из которых дает начало очагу побегов.

После формирования очага побегов его разделяют на более мелкие группы побегов, переносят на свежую питательную среду и процесс повторяется. Скорость микроклонального размножения варьирует в зависимости от вида растения, но часто возможно получать из единичной почки до миллиона растений в год.

Основными факторами, оказывающими влияние на процесс микроклонального размножения, является генотип исходного материала, тип экспланта и его физиологическое состояние, состав питательных сред и условия культивирования.

Исходным материалом могут служить верхушечные и пазушные меристемы стебля, молодые листья, элементы соцветия и цветка, луковиц и клубнелуковиц.



Наиболее подходящим материалом для получения множественных побегов являются апикальные и пазушные почки здоровых и активно растущих растений.

Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляют с помощью черенкования. Такое размножение основано на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем при удалении верхушечного побега. Из пазушных почек на питательных средах образуются побеги. Растения, сформировавшие 5-6 листочков, в стерильных условиях извлекают из пробирок и нарезают на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Черенки высаживают на глубину междоузлия в питательные среды без гормонов, либо с добавлением ауксинов.

Черенки культивируют в тех же условиях, что и меристемы: при температуре 24-25 °С днем и 19-20 °С ночью, освещенностью 2-6 лк и продолжительности фотопериода 16 часов.

Рост стебля и корней начинается на 3-4 день после посадки на питательную среду, а полностью растение формируется через 12-15 дней.

Каждое последующее черенкование проводят через 14-20 дней. Из одного растения можно получить 5-8 черенков, а через 2-3 месяца 3-5 тыс. черенков.

Нижнюю часть растения и используют для ИФА. Растения, зараженные вирусами, бракуют, а здоровые дают начало мериклонам (меристематическим клонам).

Если почки или черенки высадить на питательные среды с высоким содержанием цитокининов, то образуется конгломерат почек и побегов. Полученные побеги легко отделяются друг от друга, их можно либо укоренить, либо использовать для дальнейшего микрочеренкования.

В качестве питательных сред в большинстве случаев используют различные модификационные среды Мурасиге и Скуга, хотя некоторые виды растений могут иметь индивидуальные потребности в питательных веществах. Культивирование можно проводить как на твердых, так и жидких питательных средах.

В зависимости от комбинаций условий культивирования исходной ткани (состав питательной среды, температура, световой режим) можно вызвать развитие пазушных почек. Индуцировать появление адвентивных почек или стеблевых побегов непосредственно из клеток экспланта или из каллуса.

Для индукции множественных побегов *in vitro* в качестве экспланта обычно используют верхушечные и пазушные почки. В тоже время находит широкое применение культура апикальных меристем. Следует различать понятия «апикальная меристема» и «стеблевой апекс», определяя апикальную меристему как участок стеблевого апекса. Несмотря на некоторые трудности в работе (необходимость манипулирования эксплантами с минимальными размерами, невысокий процент выживаемости в асептических условиях), культура апикальных меристем широко используется для получения оздоровленного свободного от патогенов посадочного материала.

Для оздоровления растений используют культуру апексов или культуру апикальных меристем, так как в стеблевой апекс вирусы проникают медленнее, чем в другие части растений. При культивировании апексов размножение вирусов подавляется реакцией растительного организма на травму, вызванную отсечением верхушки. Обычно на питательные среды высаживают небольшую часть меристемы до 0,5 мм.

В целом закономерность такова: чем меньше величина меристемы, тем больше вероятность получения безвирусных растений.

Биотехнология позволяет получать безвирусный оздоровленный посадочный материал практически всех сельскохозяйственных культур. Наиболее полно разработана технология получения безвирусного картофеля. Систем первичного семеноводства и оздоровления посадочного материала картофеля включает следующие этапы: подготовка клубней для вычленения апикальных меристем, вычленение апикальных меристем, регенерация растений из меристем, адаптация растений-регенерантов в защищенном грунте, получение первой продукции безвирусного материала в открытом грунте, выращивание посадочного материала в первичных звеньях семеноводства, сохранение коллекционных сортов.

В культуре тканей используются апексы верхушечных и боковых почек. Чтобы исключить влияние метаболитов клубня на проростки и повысить регенерационную способность исходного материала из средней части клубня вырезают глазки с частью паренхимы (0,5 x 0,5 см). Глазки проращивают в песке, предварительно обработанном сухим жаром. Этиолированные проростки выращивают в темноте при температуре  $25 \pm 2$  °С, влажности воздуха 70-80 %. Песок дважды в день увлажняют, через 7-10 дней проводят подкормку растений раствором Кнопа.

Апикальные меристемы проростков изолируют на 12-13 пластохроне, т.е. промежутке времени между инициациями двух листовых бугорков.

Изолированные меристемы культивируют в асептических условиях на питательных средах с богатым содержанием макро - и микросолей, с повышенной концентрацией цитокининов (6-БАП 2мг/л). В культуральной комнате с концентрированным воздухом поддерживают температуру  $25 \pm 2$  °С, влажность воздуха 70 %, освещенностью 5 лк и фотопериод 16 часов.

В среднем от посадки меристемы на среду до формирования проростков с 5-6 листочками проходит 30-45 дней, в некоторых случаях от 2 до 8 месяцев. Среды по мере истощения обновляют, и проростки периодически пересаживают на новые среды в стерильных условиях.

Для укоренения растений, образовавшихся при микрочеренковании, их необходимо пересадить на новую питательную среду. Черенки и побеги легко укореняются на средах с обедненным составом минеральных солей (среда Уайта, Мурасиге – Скуга, разбавленная вдвое), либо на средах добавление ауксинов: ИУК, НУК, ИМК.

Проростки, сформировавшиеся в пробирках со средами, можно рассматривать как небольшие укорененные растения, которые необходимо адаптировать к обычным условиям выращивания. Такие растения лучше пересаживать в грунт, когда полностью сформируются 5-6 листьев и достаточно разрастаются корни. Однако разные виды культурных растений по-разному приспособляются к изменению условий среды. Каждое растение требует специально подобранных условий культивирования в грунте, которые устанавливают экспериментально.

*Материалы и оборудование:* побеги традисканции, питательная среда Мурасиге и Скуга, ИУК, этиловый спирт, диоксид, хлорамин, стерильная дистиллированная вода.

Термостат, пинцеты, скальпели, колбы Эрленмейера на 250 мл, пробирки, мембранный фильтр.

*Ход работы.*

Стерилизация питательных сред и растительного материала. Простерилизованные побеги традесканции разрезать на черенки длиной 2-4 см с одним или двумя листочками

Затем поместить в пробирки или колбы Эрленмейера с твердой питательной средой Мурасиге и Скуга. Для подавления бактериального заражения на первом этапе культивирования в среду можно вносить антибиотики, например, канамицин. Раствор антибиотика предварительно стерилизуют через мембранный фильтр и вносят в питательную среду, охлажденную до 40 °С.

Культивировать при температуре 20-25 °С на свету с 12 часовым фотопериодом. Через 3-4 недели от начала культивирования микрочеренки укореняются и дают побеги. Полученные побеги можно размножить путем микрочеренкования и выращивать на безгормональной среде Мурасиге и Скуга или содержащей низкие (0,1-0,2 мг/л) концентрации ИУК.

*Контрольные вопросы*

1. Что такое микрклональное размножение растений: основные этапы?
2. Каковы основные способы микрклонального размножения?
3. Как получить безвирусный посадочный материал?
4. Через какое время от начала культивирования микрочеренки укореняются и дают побеги?
5. На чем основан метод микрклонального размножения?

## Лабораторная работа № 8

### Виды брожений. Спиртовое брожение. Уксуснокислое брожение

*Цель работы:* познакомиться с качественными реакциями для определения спиртового и уксуснокислого брожения, с морфологией возбудителей этих видов брожения.

#### *Задачи:*

1. Изучить методы стерилизации посуды и питательных сред.
2. Ознакомиться с представителями спиртового и уксуснокислого брожения.
3. Разобрать морфологию и культуральные свойства дрожжей *S. cerevisiae* и уксуснокислых бактерий *A. aceti*.
4. Провести качественные реакции на спиртовое и уксуснокислое брожение.
5. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование. Методы стерилизации посуды и питательных сред.* Стерилизация - важнейший этап и главное условие получения чистых культур микроорганизмов. Стерилизуют посуду, инструменты и сами питательные среды, используемые в работе. Существует термическая и холодовая стерилизация.

Брожение - эволюционно наиболее древняя форма биологического окисления, которое обеспечивает получение энергии в анаэробных условиях. Брожение характерно для ряда групп прокариот. Основные типы брожения: спиртовое, молочнокислое и маслянокислое - были открыты Луи Пастером в 1860-х годах, хотя продукты брожения были известны человеку с незапамятных времен.

#### *Представители спиртового брожения.*

Возбудители спиртового брожения широко распространены в природе. К ним относят дикие дрожжи рода *Mycoderma* и *Torula*, плесневые грибы рода *Mucor* и некоторые бактерии. Культурные дрожжи выведены путем длительной селекции из диких дрожжей. К ним относятся: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. vini* и *S. ellipsoisd*. Эти дрожжи отличаются от диких тем, что способны выдерживать большие концентрации спирта (до 15 %) в среде, образуют меньше побочных продуктов брожения (высшие спирты или сивушные масла), вследствие чего интенсивнее идут процессы брожения. Наибольшее практическое значение имеет вид дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Штаммы *S. cerevisiae* подразделяют на расы верхового и низового брожения. Они используются в хлебопечении, получении спирта, пивоварении, виноделии, производстве кваса и некоторых кисломолочных продуктов.

#### *Представители уксуснокислого брожения.*

Уксуснокислые бактерии объединены в род *Acetobacter*. Эти бактерии встречаются повсеместно в природе, в пыли, на фруктах и овощах. Для получения энергии они окисляют этиловый спирт до этиловой кислоты и воды в строго аэробных условиях. При этом выделяется значительное количество энергии (около 500 кДж).

*Задание 1.* Опишите принципы стерилизации:

а) термической (кипячение, стерилизация сухим жаром, стерилизация паром, пастеризация);

б) холодной (фильтрование, УФ-излучение).

*Задание 2.* Опишите морфологию и культуральные свойства дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

*Задание 3.* Проведите качественную реакцию на спиртовое брожение, зарисуйте морфологию возбудителя спиртового брожения.

*Материалы и оборудование:* раствор бродящей жидкости, 10 % раствор едкого натра, йод кристаллический, петли микробиологические, набор для окрашивания по Граму (раствор Люголя, фуксин, спирт, генцианвиолет, полоски фильтровальной бумаги), предметные стекла, спиртовки, стакан на 100 мл, штатив, 2 цилиндрические пробирки, мерная пробирка.

*Ход работы:*

1. В две пробирки (одна с завинчивающейся крышкой и одна химическая) налить по 5 мл раствора бродящей жидкости.

2. Первую пробирку (с завинчивающейся крышкой) использовать для обнаружения возбудителя спиртового брожения:

а) центрифугировать пробирку 5 мин при 1,5 тыс. об./мин;

б) надосадок слить в слив, из осадка приготовить мазок, окрасить по Граму (приложение 3);

в) микроскопировать мазок при увеличении 90х (масляная иммерсия).

3. Вторую пробирку использовать для проведения качественной реакции с кристаллическим йодом:

а) к 5 мл бродящей жидкости добавить 1 мл концентрированного раствора 10 % щелочи и подогреть на спиртовке, не доводя до кипения (60 °С);

б) добавить несколько кристалликов йода и снова нагреть; в присутствии спирта выпадает желтый осадок йодоформа, имеющий характерный запах.

4. Зарисовать морфологию возбудителя спиртового брожения, подписать род/вид выделенного микроорганизма:

5. Записать уравнения реакций образования йодоформа. Какие тесты необходимо провести, чтобы определить вид микроорганизма?

*Задание 4.* Опишите морфологию типового вида уксуснокислых бактерий - *Acetobacter aceti*. Напишите уравнения цикла реакций образования уксуса из глюкозы, протекающих в клетках микроорганизмов (брожение).

*Задание 5.* Проведите качественную реакцию на уксусную кислоту, зарисуйте морфологию возбудителя уксуснокислого брожения.

*Материалы и оборудование:* кислое пиво, 10 % раствор соды, 5 % раствор хлорного железа ( $\text{FeCl}_3$ ), набор для окрашивания по Граму (раствор Люголя, фуксин, спирт, генцианвиолет, полоски фильтровальной бумаги), предметные стекла, спиртовка, штатив, цилиндрическая пробирка, мерная пробирка.

*Ход работы.*

1. Из пленки на поверхности пива сделать мазок, окрасить по Граму (приложение 3).
2. Микроскопировать мазок при увеличении 90 х (масляная иммерсия).
3. Провести качественную реакцию на уксусную кислоту:
  - а) к 5 мл скисшего пива в химическую пробирку добавить 2 мл 10 % раствора соды;
  - б) к полученной смеси добавить 1 мл 5 % раствора хлорного железа; при необходимости нагреть; при наличии уксусной кислоты появляется буро-коричневое окрашивание вследствие образования ацетата железа и характерный уксусный запах.
4. Зарисовать морфологию возбудителя уксуснокислого брожения, подписать род/вид выделенного микроорганизма:
5. Написать уравнение протекания качественной реакции на уксусную кислоту.

## Лабораторная работа № 9

### Виды брожений. Молочнокислое брожение. Определение кислотности молока

*Цель работы.* знакомство с биохимическими основами процесса молочнокислого брожения, методами обнаружения микроорганизмов - возбудителей этого вида брожения и способами определения кислотности молока.

*Задачи.*

1. Познакомиться с химизмом молочнокислого брожения.
2. Изучить морфологию представителей гомо- и гетероферментативного брожения.
3. Освоить метод определения общего количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах.
4. Освоить метод определения кислотности молока по Тернеру.
5. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование. Биохимические основы молочнокислого брожения.* Молочнокислое брожение вызывают микроорганизмы, которые с помощью фермента лактазы сбраживают молочный сахар (лактозу) или другой сахар (глюкозу) до молочной кислоты и других продуктов.



Процесс идет с накоплением энергии в виде АТФ. По характеру брожения молочнокислые бактерии делятся на 2 группы: гомоферментативные, продуктом разложения которых является молочная кислота, и гетероферментативные, вызывающие образование, кроме молочной кислоты, других продуктов брожения: спирта, уксусной кислоты, CO<sub>2</sub> и пр.

*Задание 1.* Опишите морфологию и применение 3-4 представителей гомоферментативного и гетероферментативного брожения.

*Задание 2.* Определите общее количество бифидобактерий в кисломолочном продукте.

*Материалы и оборудование:* пробирки со средой для бифидобактерий, дозаторы, стерильные наконечники, спиртовка, термостат, стерильные цилиндрические пробирки, физраствор, стерильные пипетки Пастера, пробы молочнокислых продуктов.

*Ход работы* (все работы проводить над пламенем горелки!):

1. Записать название продукта, дату изготовления, дату окончания срока годности, количество искомым микроорганизмов на конец срока годности.
2. Обработать упаковку исследуемого кисломолочного продукта спиртовым шариком, аккуратно вскрыть.

3. В четыре стерильные пробирки стерильной пипеткой Пастера налить по 9 мл физиологического раствора.

4. Приготовить серию разведений кисломолочного продукта: 1 : 10; 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000; для этого:

а) в первую пробирку пипеткой Пастера к 9 мл физраствора прилить 1 мл исследуемого продукта, пипетку замочить в дезрастворе; взять новую пипетку, тщательно перемешать суспензию;

б) этой же пипеткой отобрать 1 мл во вторую пробирку, пипетку замочить в дезрастворе; взять новую пипетку, тщательно перемешать суспензию, повторить операцию еще два раза.

5. С помощью дозатора со стерильным наконечником забрать 10 мкл суспензии из каждого разведения и посеять уколom в среду для бифидобактерий, наконечник сбросить в дезраствор (рис. 1).

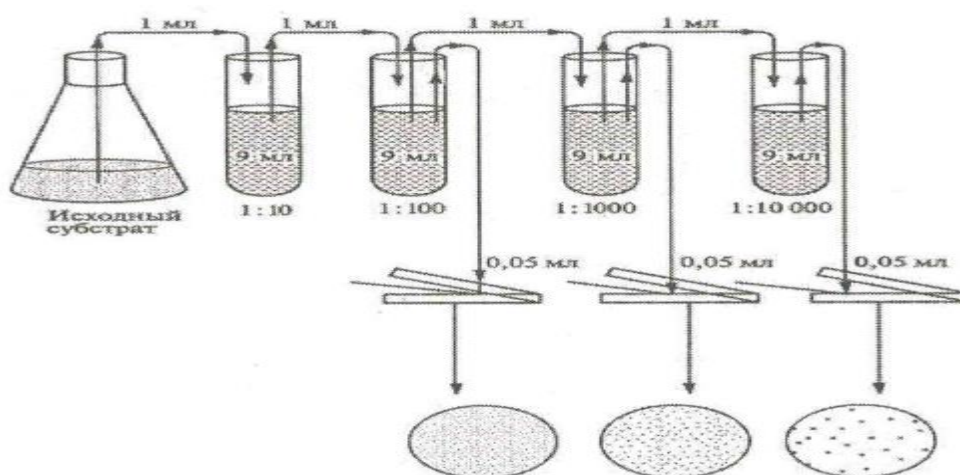


Рисунок 1. Схема титрования микроорганизмов

6. Инкубировать микроорганизмы при температуре 37 °С в течение 48-72 ч.

7. Определить количество исследуемых бактерий в кисломолочном продукте. Сделать заключение о соответствии полученного количества микроорганизмов заявленному производителем на конец срока годности. Записать название нормативного документа, регламентирующего проведение оценки качества кисломолочных продуктов.

*Задание 3.* Проведите определение кислотности молока.

*Материалы и оборудование:* свежее молоко и кисломолочный продукт, 0,1 н раствор NaOH, раствор фенолфталеина, дистиллированная вода, колбы на 50 мл, мерные пробирки.

*Ход работы:*

1. В 2 колбы на 250 мл налить 10 мл свежего молока (контрольная проба) и исследуемого кисломолочного продукта (опытная проба), добавить по 20 мл дистиллированной воды и 2-3 капли фенолфталеина, тщательно перемешать.



2. Смесь оттитровать 0,1 н раствором NaOH до появления слабо-розовой окраски индикатора.

3. Рассчитать кислотность в градусах Тернера.

Градус Тернера ( $^{\circ}$  Т) условная величина, равная количеству миллилитров 0,1 н раствора щелочи, израсходованного на титрование 100 мл молока.

*Пример расчета:* на титрование 10 мл молока пошло 5 мл 0,1 н раствора щелочи; рассчитаем количество щелочи, израсходованное на титрование 100 мл молока: 5 мл щелочи - 10 мл молока;

x мл щелочи - 100 мл молока.

Кислотность в градусах Тернера составит:  $5 \times 100 / 10 = 50$  °Т Кислотность парного молока колеблется от 10 до 25 °Т. Предельная кислотность молока колеблется от 110 до 115 °Т.

4. Сделать заключение о соответствии кислотности контрольной пробы (свежего молока) общепринятым нормам. По табличным значениям кислотности молочных продуктов определить, какой кисломолочный продукт был исследован.

## Лабораторная работа № 10

### Иммобилизация биокатализаторов включением в гели. Включение клеток дрожжей в гели агар-агара

*Цель работы.* научиться получать иммобилизованные биокатализаторы включением клеток дрожжей в агарозные гели.

*Задачи.*

1. Познакомиться с методами иммобилизации клеток.
2. Рассмотреть способы получения и физические свойства агар-агара и свойства носителей, используемых для иммобилизации клеток.
3. Освоить метод иммобилизации клеток дрожжей в гели агара.
4. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование.* С целью наиболее выгодного применения в биотехнологии клеток микроорганизмов, растений и животных широко используется технология закрепления клеток на нерастворимом носителе - иммобилизация. Одним из методов иммобилизации клеток является включение их в полимерные гели. Гель - это такое состояние системы «полимер - растворитель», когда макромолекулы полимера соединены в пространственную сетку при помощи достаточно устойчивых связей. Чтобы получить гель с включенными в него клетками, необходимо суспендировать биомассу в растворе гелеобразователей и затем создать условия перехода системы в студнеобразное состояние. В результате клетки оказываются окруженными пространственной сеткой набухшего, сшитого химическими или физическими связями полимера. Через эту сетку происходит поступление к клеткам субстратов из внешней среды и отвод метаболитов.

Для иммобилизации клеток чаще используются полисахариды: агар-агар, каррагинан, альгинаты и т. д. Благодаря наличию в гидрофильных молекулах полисахаридов большего числа электронодонорных и электроноакцепторных групп для этих соединений основным типом межмолекулярных нековалентных контактов, ответственных за формирование узлов сетки геля, является водородное связывание и в меньшей степени - гидрофобные и дисперсионные взаимодействия.

*Задание 1.* Охарактеризуйте способы получения и физико-химические свойства агар-агара.

*Задание 2.* Перечислите носители, используемые для иммобилизации клеток. Назовите преимущества и недостатки иммобилизованных клеток.

*Задание 3.* Рассчитайте количество NaCl, необходимое для получения 50 мл 3-молярного раствора (3 М).

*Задание 4.* Проведите иммобилизацию клеток дрожжей в гели агар-агара.

*Материалы и оборудование:* дрожжи, 0,9 % раствор NaCl, термостат, стакан на 50 мл, торсионные весы, сухой агар-агар, водяная баня, шприц, 3 М раствор хлористого натрия, бумажный фильтр, колба на 50 мл, 10 % раствор глюкозы.

*Ход работы:*

1. Приготовить 50 мл 0,9 % раствора NaCl.
2. Суспендировать 1 г сухих дрожжей в 4 мл 0,9 % раствора NaCl и поставить в термостат на 20 мин при 37 °С для активации дрожжей.
3. В термостойкую колбу внести 300 мг сухого агар-агара, добавить 10 мл 0,9 % NaCl и оставить на 10-15 мин при комнатной температуре для набухания.
4. Во время инкубации приготовить 50 мл 3 М раствора NaCl. Поставить раствор охлаждаться в холодильник; приготовить 10 мл 10 % раствора глюкозы.
5. После набухания поместить стакан с агар-агаром на кипящую водяную баню, нагревать до полного растворения агар-агара. Смесь непрерывно перемешивать.
6. Когда агар-агар расплавится, охладить жидкость до 45-50 °С (температура гелеобразования) и быстро влить в него, непрерывно перемешивая, суспензию клеток дрожжей.
7. Образовавшийся комплекс немедленно перенести в шприц без иглы, капать полученную смесь в охлажденный 3 М раствор NaCl, при этом должны образоваться гранулы геля, содержащие иммобилизованные клетки.
8. После этого гранулы промыть 0,9 % раствором NaCl, отделяя гранулы от промывной жидкости фильтрованием.
9. Гранулы перенести в стакан с 10 мл 10 % раствора глюкозы, с помощью глюкотеста измерить исходную концентрацию глюкозы в растворе (г/л).
10. Закрыть стакан фильтровальной бумагой, поставить в термостат на 24 ч при 37 °С.
11. Через 24 ч проверить жизнеспособность иммобилизованных клеток: с помощью глюкотеста измерить конечную концентрацию глюкозы в растворе (г/л).
12. Сделать заключение о качестве проведенной иммобилизации клеток дрожжей в агар-агар. По количеству утилизированной глюкозы рассчитать степень конверсии сахаров (в %) иммобилизованными клетками.

## Лабораторная работа № 11

### Получение микроорганизмов - продуцентов амилаз

*Цель работы.* знакомство с методами выделения накопительных культур микроорганизмов - продуцентов амилаз (сенной палочки) из объектов окружающей среды.

*Задачи.*

1. Изучить морфологию и культуральные свойства микроорганизмов - продуцентов амилаз.
2. Освоить метод выделения культуры сенной палочки, обладающей амилаолитической активностью.
3. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Задание 1.* Опишите морфологию и культуральные свойства микроорганизмов - продуцентов амилаз.

*Задание 2.* Выделите культуру сенной палочки, обладающей амилаолитической активностью.

*Материалы и оборудование:* термостат, водяная баня, сено, среда МПА с крахмалом, стакан, цилиндрическая пробирка, дозатор на 1 мл, наконечники, раствор Люголя, стекла, набор для окрашивания мазков по Граму.

*Ход работы.*

- *Получение накопительной культуры сенной палочки (*Bacillus subtilis*)*
1. Мелко нарезанное сено (1 г) залить 20 мл теплой водопроводной водой, тщательно перемешать, настоять в течение 20 мин.
  2. Полученный таким образом экстракт отфильтровать в стакан, 3-4 мл перелить в пробирку, пробирку закрыть ватно-марлевой пробкой и выдержать на кипящей водяной бане в течение 10 мин.
  - *Определение морфологических и культуральных признаков полученных культур.*
  3. 100 мкл остывшего фильтрата налить в центр чашки Петри, содержащей плотную питательную среду МПА с 1 % крахмалом.
  4. С помощью микробиологической петли тщательно растереть жидкость по поверхности чашки. Чашку поместить в термостат при температуре 35 - 37 °С на 2-3 суток для образования колоний микроорганизмов.
  - *Определение штаммов, обладающих амилаолитической активностью*
  5. Поверхность среды МПА с крахмалом, на которой выросли колонии, залить раствором Люголя. Крахмал, содержащийся в среде, окрашивается в синий цвет. Если микроорганизм обладает амилаолитической активностью, то вокруг соответствующей колонии образуется зона просветления среды. Чем больше ширина зоны, тем выше амилаолитические свойства культуры.

6. Выбрать колонию, обладающую самыми выраженными амилолитическими свойствами, описать морфологию колонии, сделать мазок, окрасить по Граму (приложение 3), зарисовать морфологию микроорганизмов - продуцентов амилаз:

7. Колонию пересеять на жидкую питательную среду МПБ с 1 % крахмалом, убрать в термостат, использовать для лабораторной работы № 12 «Определение амилолитической активности штаммов – продуцентов амилаз».

8. Сделать заключение по работе.

## Лабораторная работа № 12

### Определение амилолитической активности штаммов - продуцентов амилаз

*Цель работы.* научиться определять активность амилаз микроорганизмов *Bacillus subtilis* колориметрическим методом.

#### *Задачи.*

1. Изучить классификацию ферментов амилаз, тип катализируемой ими реакции, свойства амилолитических ферментов и их применение в биотехнологии.
2. Освоить колориметрический метод определения амилолитической активности ферментов *Bacillus subtilis*.
3. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование.* Ферменты, или энзимы - это катализаторы белковой природы, образующиеся и функционирующие во всех живых организмах. Происхождение терминов связано с тем, что первоначально ферментативные процессы были открыты и изучены в бродильном производстве. Ферментами (от лат. fermentum - «закваска») называли «организованные ферменты» (то есть сами живые микроорганизмы), а термин «энзим» (от греч. en - «в» и zyine - «закваска») был предложен в 1876 году В. Кюне для «неорганизованных ферментов», секретлируемых клетками желудка или кишечника. Через два года после смерти Л. Пастера (1897) Э. Бюхнер опубликовал работу «Спиртовое брожение без дрожжевых клеток», в которой экспериментально показал, что бесклеточный дрожжевой сок осуществляет спиртовое брожение так же, как и неразрушенные дрожжевые клетки. В 1907 году за эту работу он был удостоен Нобелевской премии.

#### *Классификация ферментов.*

Классификация ферментов основана на механизме их действия и включает шесть классов. Деление внутри классов основано на более подробной характеристике катализируемой реакции и субстратной специфичности. Каждый фермент имеет тривиальное и систематическое название, а также кодовый номер (шифр) (табл. 2).

Таблица 2

#### Классы ферментов

Класс	Тип катализируемой реакции
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции
Трансферазы	Перенос отдельных групп атомов от донорной молекулы к акцепторной молекуле
Гидролазы	Гидролитическое (с участием воды) расщепление связей
Лиазы	Расщепление связей способом, отличным от гидролиза или окисления
Изомеразы	Взаимопревращение различных изомеров
Лигазы (синтетазы)	Образование связей в реакции конденсации двух различных соединений (используется энергия АТФ)

*Задание 1.* Напишите классификацию, тип катализируемой реакции, свойства амилолитических ферментов и их применение в биотехнологии.

*Задание 2.* Определите амилолитическую активность ферментов *Bacillus subtilis* колориметрическим методом (по ГОСТ 20264.4-74).

*Материалы и оборудование:* пробирка с микроорганизмами, химическая пробирка, цилиндрические пробирки, мерная пробирка, пипетки Пастера, 1 % раствор крахмала, рабочий раствор йода, дистиллированная вода, штатив, маркер, водяная баня, центрифуга, ФЭК.

*Ход работы.*

1. Перелить жидкую питательную среду МПБ с выросшими на ней микроорганизмами из стеклянной пробирки - в пластиковую пробирку.

2. Центрифугировать пробирку с микроорганизмами 5 мин при 1,5 тыс. об./мин.

3. В две цилиндрические пробирки налить по 5 мл 1 % раствора крахмала и поставить их в водяную баню с температурой 30 °С на 10 мин.

4. Через 10 мин, не вынимая пробирок из водяной бани, налить в первую пробирку 2 мл дистиллированной воды (контрольная проба), во вторую - 2 мл отцентрифугированной культуральной жидкости (опытная проба).

5. Смеси быстро перемешать и выдержать в водяной бане 10 мин.

6. Из контрольного и опытного растворов отобрать по 1 мл раствора и перенести их в пробирки с 5 мл рабочего раствора йода. Содержимое пробирок перемешать. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный - синюю, опытный - фиолетовую различной интенсивности в зависимости от количества не прогидролизованного крахмала.

7. Непосредственно после смешивания растворов определить их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре (ФЭК), используя светофильтр с максимум светопропускания при  $\lambda = 656$  нм (650-670 нм).

8. Контрольным раствором при колориметрировании исследуемых растворов является дистиллированная вода.

9. Оптическая плотность контрольного раствора  $D_1$  соответствует количеству исходного крахмала субстрата. Оптическая плотность опытного раствора  $D_2$  соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между показателями оптических плотностей растворов соответствует гидролизованному количеству крахмала субстрата. Количество гидролизованного крахмала  $C$  (в граммах) определяют по формуле:

$$C = 0,1 \cdot (D_1 - D_2) / D_1,$$

где 0,1 - количество крахмала, взятого на испытание в качестве субстрата, г.

10. Если количество гидролизованного крахмала меньше 0,02 или больше 0,07 г, то испытания повторяют. Для этого при приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления. Если в результате ферментативной реакции количество

превращенного крахмала находится в указанных пределах, полученные данные используют для расчета амилолитической активности.

11. Амилолитическую активность АС (ед./мл) препаратов бактериального происхождения определяют по формуле

$$AC = (5,885 \cdot c + 0,001671) \cdot 1000 / n,$$

где 5,885 и 0,001671 - коэффициенты расчетного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества гидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания (в коэффициенты введен множитель для пересчета на 1 ч действия фермента); с - количество прогидролизованного крахмала, г; 1000 - коэффициент пересчета миллиграммов в граммы; n - количество ферментного препарата (культуральной жидкости), взятое для испытания, мг или мл.

12. Рассчитайте амилолитическую активность ферментов *Bacillus subtilis*. Сделайте заключение о возможности использования полученного штамма *Bacillus subtilis* в биотехнологии.



## Практическая работа № 13

### Биотехнология в охране окружающей среды

*Цель работы.* получить представления об особенностях использования биотехнологических процессов в охране окружающей среды.

#### *Задачи.*

1. Прослушать доклады на следующие темы:
  - Рекультивация земель и водных ресурсов, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.
  - Биотехнология очистки сточных вод.
  - Утилизация твердых отходов с помощью биотехнологических производств.
  - Биотехнологическая очистка атмосферного воздуха.
  - Сохранение и восстановление биоразнообразия при добыче полезных ископаемых.

План докладов представлен в приложении 4.

2. Выполнить задание к практической работе.

*Задание 1.* Дайте ответы на следующие вопросы по темам докладов:

1. Перечислите и кратко охарактеризуйте физические методы очистки почвы от нефти.
2. В чем принципиальное отличие азротэнков от метатэнков?
3. Во что превращают использованный пластик на современных заводах по переработке мусора?
4. Какие вещества являются основными загрязнителями атмосферного воздуха в России?
5. Какой самый распространенный способ использования карьеров, образовавшихся после добычи полезных ископаемых?

## Лабораторная работа № 14

### Периодическое культивирование *E. coli* в лабораторном ферментере

*Цель работы:* научиться культивировать микроорганизмы в лабораторном ферментере, определять фазы и удельную скорость роста микроорганизмов.

*Задачи.*

1. Ознакомиться с периодическим методом культивирования микроорганизмов и областью его применения.
2. Рассмотреть схему и основные узлы ферментера для периодического культивирования микроорганизмов на примере ферментера BLBIO-M.
3. Освоить метод ферментации *E. coli* в лабораторном ферментере.
4. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование. Периодический метод культивирования микроорганизмов.* Процесс периодического культивирования *Escherichia coli* ATCC 25922 осуществляют в лабораторном ферментере (рабочий объем 1 л), оснащенный барботером (обеспечивающим аэрацию питательной среды) и нагревательным прибором, позволяющим поддерживать оптимальную температуру культивирования.

Периодическая культура представляет собой популяцию клеток в ограниченном объеме среды. В среду в процессе культивирования не добавляются питательные вещества и не удаляются продукты метаболизма. Рост популяции микроорганизмов в такой замкнутой системе характеризуется специфической S-образной кривой. Она описывает зависимость логарифма числа живых клеток от времени культивирования (рис. 2).



Рисунок 2. Фазы культивирования микроорганизмов

I. Фаза приспособления, или так называемая фаза адаптации микроорганизмов, или лаг-фаза. В этой фазе нет деления и, соответственно, роста

микроорганизмов, но происходит активация биохимических ферментов, белков и нуклеиновых кислот.

2. Логарифмическая фаза роста (экспоненциальная кривая), когда компонентов питания достаточно и биообъект полностью адаптирован к условиям в ферментере. Все клетки находятся в состоянии активного размножения, численность их возрастает в геометрической прогрессии. Скорость их роста является постоянной и максимальной - она зависит от физиологических особенностей вида и состава питательной среды.

3. Стационарная фаза. Устанавливается равновесие между числом жизнеспособных и отмирающих клеток, скорость роста равна нулю. Количество живых клеток в среде остается некоторое время практически неизменным. Концентрация биомассы достигает практически своего максимума.

4. Фаза замедленного роста клеток. Из-за большой плотности популяции возникает пространственная ограниченность, ухудшается поступление в клетку питательных веществ и вывод продуктов метаболизма, уменьшается поверхность контакта клеток со средой. При этом часть клеток погибает.

5. Фаза гибели клеток. По мере уменьшения числа жизнеспособных клеток и наступления автолиза, популяция переходит в фазу отмирания, для нее характерно, что отмирание клеток преобладает над размножением. В данной фазе возможен критический рост, то есть рост одних клеток за счет продуктов других клеток. Скорость отмирания популяции изменяется в широких пределах. Она зависит от видовых особенностей культуры, условий культивирования в периодической системе.

Наиболее важными параметрами, которые характеризуют рост популяции в периодической культуре, являются: прирост биомассы и удельная скорость роста.

Прирост биомассы определяется как разность между количеством биомассы, полученной в стационарной фазе и количеством посевного материала.

Удельная скорость роста показывает прирост единицы биомассы в единицу времени.

*Задание 1.* Напишите области применения периодического метода культивирования в промышленности. Чем он принципиально отличается от непрерывного культивирования.

*Задание 2.* Нарисуйте схему ферментера для периодического культивирования микроорганизмов, подпишите основные рабочие узлы.

*Задание 3.* Проведите ферментацию *E. coli* в лабораторном ферментере, нарисуйте кривую роста бактерий, рассчитайте удельную скорость роста микроорганизмов.

*Материалы и оборудование:* ферментер, спектрофотометр, среда МПБ, среда МПБ с суточной культурой *E. coli*, шприц для внесения культуры.

*Ход работы* (работать в перчатках!!!):

1. Открыть кран подачи воды в рубашку (для охлаждения ферментера).

2. Включить ферментер, подняв вверх тумблер Power на передней панели блока управления. Проконтролировать повышение температуры внутри ферментера до 37 °С.

3. С помощью ротаметра установить скорость подачи воздуха 20 л/мин.

4. Включить мешалку, с помощью ручки-регулятора установить скорость вращения мешалки 200 об./мин.

5. Произвести внесение посевного материала в ферментер:

а) над пламенем горелки стерильным шприцем собрать суточную культуру *E. coli* из двух пробирок (общий объем 10 мл);

б) окунуть трубочку для засева культуры в стакан со спиртом, быстро снять зажим и внести (впрыскиванием) посевной материал в ферментер, надеть зажим.

6. Через 2-3 мин провести отбор пробы из ферментера для определения начальной концентрации микроорганизмов в среде:

а) открыть зажим на трубке около пробоотборника, надеть зажим на трубку около барботера;

б) два-три раза сжать трубку около пробоотборника, чтобы выдуть старую среду из пробоотборника;

в) открыть зажим на трубке около баночки для отбора проб, набрать воздух в шприц, подведенный к баночке для отбора, при этом среда должна набраться в баночку;

г) надеть зажим на трубку, ведущую к баночке для отбора проб, снять зажим с трубки для слива среды;

д) выдуть воздух из шприца в баночку для отбора проб, при этом среда из баночки должна поступить в сливную трубку, надеть зажим на сливную трубку.

7. Измерить начальную концентрацию *E. coli* (оптическую плотность культуры) в посевном материале на спектрофотометре:

а) включить спектрофотометр BioPhotometer в сеть, выбрать программу для измерения оптической плотности микроорганизмов (OD 600);

б) в кювету для спектрофотометра налить 200 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), поместить кювету с буфером в кюветный отсек, нажать кнопку Blank дождаться появления в центре экрана значения 0,00;

в) слить ФСБ из кюветы, в кювету налить 200 мкл культуральной жидкости, поместить кювету с образцом в кюветный отсек, измерить оптическую плотность образца, нажав кнопку Sample. В центре появится значение оптической плотности исследуемого образца.

8. Дорисовать особенности обвязки ферментера BLBIO-M на схеме ферментера для периодического культивирования микроорганизмов.

9. Через 15, 30, 45, 60 и 240 мин после начала ферментации отобрать пробы культуральной жидкости, измерить оптическую плотность культуры микроорганизмов (повторить п. 6, 7). Данные занести в таблицу 3.

10. Нарисовать график зависимости оптической плотности культуры от времени ферментации.

11. Рассчитать удельную скорость роста *E. coli*. по формуле

$$\ln X_1 - \ln X_0 / T_1 - T_0,$$

где  $X_0$  и  $X_1$  - значения оптической плотности культуральной жидкости, соответствующие времени роста 60 и 240 мин.

Таблица 3

Результаты опыта

Время, мин.	Оптическая плотность культуры	Кривая роста <i>E. coli</i> ATCC 25922
0		
15		
30		
45		
60		
240		

12. Сделать заключение по работе. На какой фазе роста Вы остановите ферментацию?

## Лабораторная работа № 15

### Количественное определение аскорбиновой кислоты в различных объектах

*Цель работы:* познакомиться с методами качественного и количественного определения аскорбиновой кислоты в различных объектах.

#### *Задачи.*

1. Рассмотреть способы получения аскорбиновой кислоты (витамина С) в биотехнологическом производстве.
2. Освоить метод Тильманса для количественного определения аскорбиновой кислоты в различных объектах.
3. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование.* Витамин С (аскорбиновая кислота) является одним из важнейших факторов питания. Суточная потребность в витамине С для человека составляет 75 мг. Недостаток или отсутствие витамина С в пище в течение продолжительного времени приводит к тяжелому заболеванию, известному под названием «цинга».

Аскорбиновая кислота весьма нестойка и легко окисляется на воздухе. Нагревание ускоряет окисление (разрушение) витамина С. В таблице 4 приведено содержание витамина С в некоторых пищевых продуктах:

Таблица 4

Содержание витамина С в некоторых пищевых продуктах

Продукт	Количество аскорбиновой кислоты, мг на 10 г сырого продукта
Шиповник сухой очищенный	от 120 до 25 000
Смородина чёрная	100-400
Хвоя ели, сосны	150-250
Надпочечники быка (корковый слой)	150-190
Петрушка (зелень)	100
Лимон	40
Капуста белокочанная	25-66
Молоко кобылье и кумыс	20-30
Картофель	6-17
Молоко женское	3-5

Витамин С участвует в окислительно-восстановительных процессах. Имеются предположения, что витамин С участвует в реакциях гидроксирования пролина и лизина при синтезе коллагена, синтезе гормонов коры надпочечников (кортикостероидов), аминокислоты триптофан и, возможно, в других реакциях

гидроксирования. Имеются доказательства необходимости участия витамина С в окислительном распаде тирозина и гемоглобина в тканях.

*Задание 1.* Перечислите и кратко охарактеризуйте методы получения витамина С в биотехнологическом производстве.

*Задание 2.* Напишите принцип метода определения витамина С по Тильмансу. Какие вещества могут помешать точному количественному определению аскорбиновой кислоты и почему?

*Задание 3.* Определите концентрацию аскорбиновой кислоты 2,6-дихлорфенолиндофенолятом (по Тильмансу) в хвое сосны и в плодах шиповника.

*Материалы и оборудование:* 0,001 М раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, 2 % раствор HCl, песок кварцевый, хвоя сосны, сухой шиповник, прибор для титрования, ступка фарфоровая с пестиком, ножницы, мерные стаканчики на 50 мл, мерный цилиндр, конические колбы, пипетки Пастера, бумажный фильтр.

*Ход работы.*

1. Приготовить точные навески хвои и плодов шиповника массой 1 г.
2. Хвою измельчить с помощью ножниц, поместить в фарфоровую ступку.
3. Тщательно растереть хвою в фарфоровой ступке с щепоткой кварцевого песка и 5 мл 2 % раствора соляной кислоты (в течение не менее 5 мин!).
4. Затем без потерь (обмывая ступку и пестик дистиллированной водой) перенести содержимое ступки в мерный цилиндр емкостью 50 мл и довести раствор дистиллированной водой до метки 50 мл.
5. Содержимое стаканчика тщательно перемешать, дать настояться 10 мин.
6. Профильтровать все содержимое (50 мл) через бумажный фильтр в новый стаканчик, фильтрат использовать для определения витамина С.
7. Пункты со 2 по 7 повторить для плодов шиповника.
8. Пипеткой Пастера отмерить в коническую колбу 5 мл фильтрата, титровать 0,001 М раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розового окрашивания, не исчезающего около 30 с.
9. Расчет количества аскорбиновой кислоты в пробе провести исходя из того, что 1 мл 0,001 М раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты. При расчете на 10 г вещества необходимо учитывать также разведение и количество исходного вещества.
10. Сделать заключение по работе о том, какой продукт содержит больше витамина С и более пригоден для его получения в промышленных масштабах.

## Лабораторная работа № 16

### Изучение защитного действия криопротекторов на устойчивость растительных клеток к действию низких температур

*Цель работы.* изучить влияние различных криопротекторов на устойчивость клеток к низким температурам.

#### *Задачи.*

1. Познакомиться с понятием «криопротекторы» и областью их применения.
2. Рассмотреть виды криопротекторов, применяемых в природной среде и в лабораторных условиях.
3. Изучить свойства сахарозы и глицерина как основных криопротекторов для растительных клеток.
4. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование.* При воздействии отрицательных температур в межклетниках растительных тканей образуются кристаллы льда, что приводит к повреждению клеточных мембран и обезвоживанию цитоплазмы. Увеличение количества криопротекторов в зимующих органах растений повышает водоудерживающую способность тканей и тем самым приводит к повышению их морозоустойчивости.

Плазмолиз - отделение протопласта от клеточной стенки в гипертоническом растворе.

*Задание 1.* Ответьте на вопросы. Что такое криопротекторы? Какие виды криопротекторов выделяют?

*Задание 2.* Опишите область применения криопротекторов.

*Задание 3.* Изучите действие криопротекторов на устойчивость растительных клеток к действию низких температур.

*Материалы и оборудование:* 1 М раствор сахарозы, 1 М раствор глицерина, 8 % раствор NaCl, дистиллированная вода, пробирки, штативы для пробирок, микроскопы, термометры, стерильные препаровальные иглы, скальпели, пипетки, стеклянные палочки, предметные и покровные стекла, лёд, охлаждающая смесь (3 части льда, 1 часть соли, температура около - 20 ° С), корнеплоды свёклы.

#### *Ход работы.*

1. Из корнеплода свёклы вырезать ножницами несколько пластинок толщиной 5 мм.
2. Пластинки ополоснуть водой до полного удаления остатков клеточного сока, поместить в пробирки:
  - а) 5 мл дистиллированной воды;
  - б) 2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл воды;



- в) 5 мл 1 М раствора сахарозы;
  - г) 2,5 мл 1 М раствора глицерина и 2,5 мл воды;
  - д) 5 мл 1 М раствора глицерина;
  - е) 2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл 1 М раствора глицерина.
3. Пробирки поместить в охлаждающую смесь (лед с солью) на 25 мин.
4. Приготовить микропрепарат среза корнеплода свеклы, рассмотреть под микроскопом (увеличение  $\times 10$ ), зарисовать клеточное строение корнеплода свеклы (наблюдаем равномерное окрашивание всех клеток):
5. Вынуть пробирки из охлаждающей смеси. Перед размораживанием пронаблюдать окрашивание раствора в пробирках.
6. Разморозить растворы в стакане воды комнатной температуры.
7. Микроскопировать пластинки корнеплодов свеклы из растворов криопротекторов (увеличение  $\times 10$ ). Оформить рисунки препаратов в разных растворах: 1) Дистиллированная вода; 2) 1 М раствор сахарозы с водой; 3) 1 М раствор сахарозы; 4) 1 М-раствор глицерина с водой; 5) 1 М раствор глицерина; 6) 1 М раствор сахарозы/глицерина.
8. В каждом препарате посчитать % окрашенных клеток. Результаты занести в таблицу 5:

Таблица 5

Результаты опыта

№	Раствор	Количество окрашенных клеток, %
1	5 мл дистиллированной воды	
2	2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл воды	
3	5 мл 1 М раствора сахарозы	
4	2,5 мл 1 М раствора глицерина и 2, 5 мл воды	
5	5 мл 1 М раствора глицерина	
6	2, мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл 1 М раствора глицерина	

9. Для проверки жизнеспособности клеток провести плазмолиз. Для этого тонкие срезы анализируемого материала поместить на 10 мин в 8 % раствор  $\text{NaCl}$ . Затем препарат рассмотреть под микроскопом (увеличение  $\times 40$ ).
- 1) Дистиллированная вода; 2) 1 М раствор сахарозы с водой; 3) 1 М раствор глицерина; 4) 1 М раствор сахарозы/глицерина; 5) 1 М раствор сахарозы; 6) 1 М раствор глицерина с водой
10. Сделать заключение по работе. Какое вещество из изученных является наиболее эффективным криопротектором?

## Лабораторная работа № 17

### Выделение и определение концентрации бактериальной ДНК

*Цель работы:* познакомиться с методом фенольно-хлороформного выделения ДНК из бактериальных клеток (*E. coli*) и определить концентрацию выделенного продукта с помощью спектрофотометра.

*Задачи:*

1. Ознакомиться с принципом и основными этапами выделения ДНК.
2. Изучить принципы выделения ДНК методом электрофореза в агарозном геле.
3. Освоить фенольно-хлороформный метод выделения ДНК из клеток *E. coli*.
4. Определить концентрацию выделенной ДНК с помощью спектрофотометра BioPhotometer.
5. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование. Основные сведения о выделении ДНК.*

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. От ДНК напрямую или через белки-ферменты зависят все биосинтезы и катаболизм клетки. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а хромосомную ДНК очистить от других клеточных компонентов. Прежде всего, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить ее целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

- 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом);
- 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизация клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;
- 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл;
- 4) осаждение ДНК из раствора этанолом и растворение осадка в буферном растворе.

Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия, для экстракции ДНК - смесь фенола-хлороформа. Ряд современных методов предусматривает сорбцию ДНК на гранулах силикагеля, центрифугирование и последующую элюцию ДНК с гранул в раствор. Другими вариантами выделения ДНК являются: сорбция ДНК на магнитных частицах, мембранах или ионообменных сорбентах. Количественная и качественная оценка образца полученной ДНК осуществляется при последующей стандартной процедуре

электрофореза ДНК в агарозном геле путем визуального сравнения с образцами известной концентрации или спектрофотометрическое определение.

*Задание 1.* Напишите принцип и основные этапы электрофореза ДНК в агарозном геле.

*Задание 2.* Выделите ДНК из клеток *E. coli* с помощью фенольно-хлороформного метода.

*Материалы и оборудование:* ТЕ буфер, 5 % раствор додецилсульфата натрия, лизоцим, фенол, хлороформ, изопропанол, дозаторы объемом 200-1000 мкл и 5-50 мкл, спирт этиловый 80 %, микроцентрифуга, вортекс.

*Ход работы* (все работы выполнять в ламинарном шкафу!):

1. Из пробирки с суточной культурой *E. coli* перенести пипеткой Пастера 1,0 мл взвеси клеток в пластиковую пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл.

2. Осадить клетки микроорганизмов 5 мин центрифугированием при 4 °С, 10 тыс. об./мин.

3. Удалить супернатант (вылить питательную среду через край в слив). К осадку клеток микроорганизмов добавить 300 мкл ТЕ буфера и ресуспензировать клетки с помощью дозатора.

4. К суспензии клеток добавить 100 мкл 5 % раствора додецилсульфата натрия (SDS) и перемешать переворачиванием пробирки 3 раза.

5. К суспензии клеток добавить 100 мкл лизоцима (100 мкг/мл), инкубировать 15 мин при температуре 37 °С.

6. К суспензии клеток добавить 600 мкл изопропанола, перемешать переворачиванием пробирки 3 раза, центрифугировать в течение 10 мин при 4 °С, 10 тыс. об./мин.

7. Осторожно с помощью дозатора удалить супернатант в слив, к осадку добавить 300 мкл ТЕ буфера, ресуспензировать.

8. Быстро перенести полученный раствор в эппендорф с 200 мкл хлороформа, эппендорф закрыть, смесь перемешать переворачиванием до образования стойкой эмульсии, инкубировать 5 мин при нормальных условиях. Центрифугировать 10 мин при 4 °С, 10 тыс. об./мин.

9. Верхний водный слой, содержащий ДНК (до белесого кольца белков) перенести микропипеткой в чистую 1,5 мл пробирку типа эппендорф.

10. Добавить в пробирку с ДНК 500 мкл изопропанола, перемешать, инкубировать 5 мин при нормальных условиях, центрифугировать 5 мин при 4 °С, 10 тыс. об./мин.

11. ДНК в виде белых нитей располагается на дне пробирки. Осторожно удалить 1/2 надосадка в слив, к осадку добавить 500 мкл 80 % этилового спирта, перемешать с помощью дозатора, центрифугировать 5 мин при 4 °С, 10 тыс. об./мин.

12. Аккуратно удалить весь спирт с помощью дозатора, осадок высушить «на воздухе» при открытой крышке эппендорфа.

13. К осадку добавить 50 мкл TE-буфера, перемешать, измерить концентрацию ДНК на спектрофотометре.

*Задание 3.* Измерьте концентрацию ДНК, выделенной из *E. coli* с помощью спектрофотометра BioPhotometer.

*Материалы и оборудование:* спектрофотометр, кюветы к нему, фосфатный буфер, ДНК.

*Ход работы.*

1. Включить спектрофотометр в сеть, выбрать программу для измерения двухцепочечной ДНК (dsDNA).

2. В кювету для спектрофотометра налить 180 мкл фосфатного буфера, поставить в кюветный отсек спектрофотометра, нажать кнопку Blank. На экране в центре появится значение 0.000.

3. Вытащить кювету, осторожно добавить в нее 20 мкл раствора ДНК, перемешать.

4. Ввести в спектрофотометр разведение ДНК: нажать кнопку Dilution, ввести количество образца (20 мкл), нажать кнопку Enter, ввести количество растворителя (180 мкл), нажать кнопку Enter.

5. Поместить кювету с образцом в кюветный отсек, измерить концентрацию выделенной ДНК, нажав кнопку Sample. В центре - значение ДНК в исследуемом образце, справа внизу - оптическая плотность (ОП) образца при разных длинах волн (от 230 до 320 нм). В образцах ДНК, не содержащих примеси, ОП при длине волны 320 нм должна быть равно 0.

6. Записать концентрацию выделенной ДНК. Сделать вывод о качестве выделения ДНК. Какое количество ДНК нужно для проведения полимеразной цепной реакции?

## Лабораторная работа № 18

### Определение содержания основных пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений

*Цель работы:* познакомиться с методами качественного и количественного определения основных пигментов (хлорофилла а, β и каротиноидов) фотосинтетического аппарата растительной клетки.

*Задачи:*

1. Ознакомиться с основными методами разделения смеси пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений.
2. Освоить методы качественного и количественного определения содержания основных пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений.
3. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование.* Качественный и количественный состав пигментов является (в физиологическом смысле) показателем приспособленности растения к условиям окружающей среды. Так, количество хлорофилла и каротиноидов, приходящееся на единицу веса, различно у растений, адаптированных к разным условиям освещения: наибольшее общее содержание хлорофилла и каротиноидов наблюдается у теневыносливых растений. Соотношение хлорофиллов α и β (Chl α/ Ch1 β) также является показателем хроматической адаптации и меняется в ряду растений:

теневыносливые → светолюбивые → альпийские: 2,5 → 3,5 → 3,9 → до 5,5.

Содержание хлорофилла в исследуемом образце необходимо знать, чтобы рассчитать удельную интенсивность фотосинтетической реакции.

*Задание 1.* Перечислите основные методы разделения смеси пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений. Дайте краткую характеристику каждого метода.

*Задание 2.* Получите спиртовую вытяжку смеси пигментов зеленого листа, опишите оптические свойства хлорофилла.

*Материалы и оборудование:* свежие листья какого-либо зеленого растения, 96 % спирт, мел, вода, вазелин, ступка фарфоровая с пестиком, пробирки, воронка, фильтровальная бумага, стеклянная палочка, пинцет, штатив, ножницы, шпатель, скальпель.

*Ход работы:*

1. Навеску растительного материала 100 мг измельчить ножницами и поместить в фарфоровую ступку.

2. Добавить к растительному материалу мел на кончике скальпеля и растереть в фарфоровой ступке с 2-3 мл этилового спирта до образования однородной кашицы.

3. К растертой массе прилить чистый этиловый спирт, доводя объем до 20 мл, тщательно перемешать, накрыть фильтровальной бумагой и дать настояться 5 мин.

4. Приготовить складчатый фильтр, смочить водой и поместить в воронку.

5. Носик ступки с внешней стороны смазать вазелином.

6. Полученную спиртовую вытяжку пигментов отфильтровать. Для этого стеклянную палочку поставить в воронку под углом  $60^\circ$  и осторожно слить настоявшийся раствор спиртовой вытяжки смеси пигментов на фильтр. Довести объем вытяжки до 25 мл. Полученная вытяжка содержит сумму зеленых и желтых пигментов.

7. Стаканчик со спиртовой вытяжкой рассмотреть в проходящем свете так, чтобы в глаз попали лучи, прошедшие через стаканчик с вытяжкой. Отметить окраску. Рассмотреть спиртовую вытяжку в проходящих лучах через синий светофильтр. Отметить окраску.

8. Пробирку со спиртовой вытяжкой хлорофилла поместить над источником света. Позади пробирки поместить темный фон и рассмотреть спиртовую вытяжку с той стороны, откуда падает свет (то есть в отраженном свете). Отметить окраску (табл. 6).

Таблица 6

Результаты опыта

Окраска спиртовой вытяжки хлорофилла в проходящем свете		Окраска спиртовой вытяжки хлорофилла в отраженном свете
Невооруженным глазом	Через синий светофильтр	

Сделать заключение об оптических свойствах хлорофилла.

*Задание 3.* Разделите пигменты фотосинтетического аппарата высших растений методом бумажной хроматографии.

*Материалы и оборудование:* спиртовая вытяжка пигментов, химически стаканчик, фильтровальная бумага, ножницы, стеклянная палочка.

*Ход работы:*

1. Вырезать полоску фильтровальной бумаги 2 x 15 см. На расстоянии 1-1,5 см от узкого края сделать черту простым карандашом.

2. Налить небольшое количество вытяжки пигментов в новый стаканчик и погрузить в нее полоску под углом 30- 60 °к стенке стакана.

3. Бумагу в стакане с вытяжкой оставить на 10-15 мин, затем аккуратно достать и просушить.

4. Зарисовать полученную на полоске хроматограмму и сделать вывод о причинах разделения пигментов на бумаге.

*Задание 4.* Изучите химические свойства хлорофилла.

*Материалы и оборудование:* этиловый спирт, 20 % NaOH или KOH, 10 % соляная кислота в капельнице, уксуснокислая медь, бензин.

*Ход работы:*

1. В пробирку с 2-3 мл спиртового раствора пигментов прилить 1 мл 20 % раствора NaOH, взболтать.

2. После смешивания экстракта со щелочью пробирку поместить на кипящую водяную баню. Как только раствор закипит, пробирку вынуть и охладить.

3. К охлажденному раствору добавить равный объем бензина и несколько капель воды для лучшего разделения смеси. Затем содержимое пробирки резко встряхнуть и дать ему отстояться.

4. По окончании опыта зарисовать окраску слоев, указав распределение пигментов.

5. Написать реакцию омыления эфирных групп хлорофилла.

6. В пробирку налить 2-3 мл спиртовой вытяжки хлорофилла.

7. К вытяжке пигментов добавить одну-две капли 20 % HCl и осторожно перемешать. Отметить изменение окраски.

8. В эту пробирку добавить один-два кристаллика  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  нагреть раствор на водяной бане до изменения окраски.

9. Сделать заключение по работе. Написать химические формулы феофитина и медьпроизводного хлорофилла.

*Задание 5.* Определите количество основных фотосинтетических пигментов с помощью спектрофотометра.

*Материалы и оборудование:* спектрофотометр, спиртовая вытяжка пигментов, спирт.

*Ход работы:*

1. Для расчета концентрации хлорофиллов  $\alpha$  и  $\beta$  и каротиноидов в вытяжке пигментов определить оптическую плотность вытяжки на спектрофотометре при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения определяемых пигментов в данном растворителе:  $\lambda = 663, 646$  и  $470$  нм. Контроль - чистый растворитель (96 % спирт).

2. Концентрацию пигментов в вытяжке рассчитать по следующим формулам:

$$C_{\text{Ch1}\alpha} [\text{мг/л}] = 12,2I D_{663} - 2,81D_{646}$$

$$C_{\text{Ch1}\beta} [\text{мг/л}] = 20,13D_{646} - 5,03D_{663}$$

$$C_{\text{Car}} [\text{мг/л}] = (1000D_{470} - 3,27C_{\text{Ch1}\alpha} - 100C_{\text{Ch1}\beta}) / 229,$$

где  $D_{470}$ ,  $D_{646}$  и  $D_{663}$  - оптическая плотность вытяжки при 470, 646 и 663 нм соответственно;  $C$  - концентрация пигмента в вытяжке, мг/л.

3. Установив концентрацию пигмента в вытяжке, определить его содержание в исследуемой ткани с учетом объема вытяжки и массы пробы:

$$F \text{ [мг/г сырой массы]} = (V \cdot C) / P,$$

где F - содержание пигмента в растительном материале, мг/г сырой массы; V- объем вытяжки, л; C- концентрация пигмента, мг/л; P- навеска растительного материала, г.

4. Рассчитать соотношение пигментов Chl  $\alpha$  / Chl  $\beta$  и (Chl  $\alpha$  +  $\beta$ ) / car.

Количество пигментов выражают в миллиграммах на единицу сырой или сухой массы, на единицу площади листа и в процентах от сухой (сырой) массы.

5. Сделать заключение по работе. Написать значения содержания хлорофилла и каротиноидов для исследуемого вами растения.



## Лабораторная работа № 19

### Определение токсичности проб воды и снега на основе измерений интенсивности свечения реагента энзимолюм

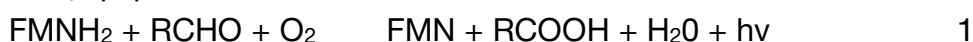
*Цель работы:* познакомиться с биолюминесцентным методом определения токсичности проб воды и снега путем измерения интенсивности свечения реагента энзимолюм.

*Задачи.*

1. Ознакомиться с принципом работы реагента энзимолюм.
2. Изучить процесс биолюминесценции, и ее примеры в живом мире.
3. Освоить метод определения токсичности различных проб на основе измерений интенсивности свечения реагента энзимолюм.
4. Выполнить задания к лабораторной работе.

*Теоретическое обоснование.* Реагент энзимолюм изготовлен на основе биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза, иммобилизованной в крахмальный гель совместно с субстратами (миристиновым альдегидом и NADH). Фермент люцифераза катализирует реакцию окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов при участии восстановленного флавинмононуклеотида; продуктом реакции является излучение света в сине-зеленой области спектра (реакция 1). Для обеспечения люциферазы восстановленным флавинмононуклеотидом применяется сопряжение люциферазной реакции с реакцией, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой (реакция 2).

Люцифераза



NADH:FMN-оксидоредуктаза



На основе биферментной системы разработаны методы оценки интегральной токсичности различных сред.

Определение токсичности проб основано на регистрации различий максимальной интенсивности свечения реагента энзимолюм в дистиллированной воде (контроль) и тестируемых пробах (опыт). Токсическое действие исследуемых проб на реагент энзимолюм определяется по изменению интенсивности биолюминесценции за 2 мин период экспозиции. Критерием токсичности тестируемой пробы является снижение на 20 % и более (ингибирование) величины максимальной интенсивности свечения реагента при воздействии химических веществ, присутствующих в пробе, по сравнению с максимальной интенсивностью свечения реагента в дистиллированной воде.

Количественная оценка степени влияния тестируемой пробы на интенсивность свечения реагента энзимолюм выражается в виде безразмерной величины - люциферазного индекса токсичности ЛИТ, определяемой по формуле

$$\text{ЛИТ} = (I_k - I_0) / I_k \cdot 100\%$$

где  $I_k$  - максимальная интенсивность свечения реагента энзимолюм в контрольной пробе;  $I_0$  - максимальная интенсивность свечения реагента энзимолюм в опытной пробе.

*Задание 1.* Ответьте на вопросы. Что такое биолюминесценция? Приведите примеры живых организмов, обладающих данным свойством, охарактеризуйте молекулярные механизмы биолюминесценции.

*Задание 2.* Проведите определение токсичности снега/моющего средства с помощью реагента энзимолюм.

*Материалы и оборудование:* реагент энзимолюм, дистиллированная вода, снег, флавиномононуклеотид, биолюминометр и кюветы к нему, автоматические дозаторы на 10 и 300 мкл и наконечники к ним, мерные стаканчики, мерный цилиндр.

*Ход работы* (поддерживать температуру всех проб на уровне 25 °С!):

1. В мерный стаканчик на 50 мл налить дистиллированной воды - контрольная проба.
2. Во второй стаканчик набрать снег, дать растаять, чтобы получилось примерно 20 мл воды - опытная проба.
3. Провести разведение опытной пробы дистиллированной водой в 2, 10 и 50 раз.
4. На компьютере включить программу Lumishot, нажать вкладку «Новое измерение».
5. Выставить период измерения 1 с.
6. В две чистые кюветы пинцетом внести один диск реагента энзимолюм, добавить 300 мкл дистиллированной воды.
7. Начать измерение, нажав на старт, через 5-10 с нажать «Вычисть фон».
8. Добавить в 1 кювету 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN. Кювету поместить в биолюминометр, закрыть крышку и зарегистрировать максимальную интенсивность свечения реагента в контрольной пробе  $I_k$  (в течение 2 мин).

Изображение должно выглядеть следующим образом (рис. 3):

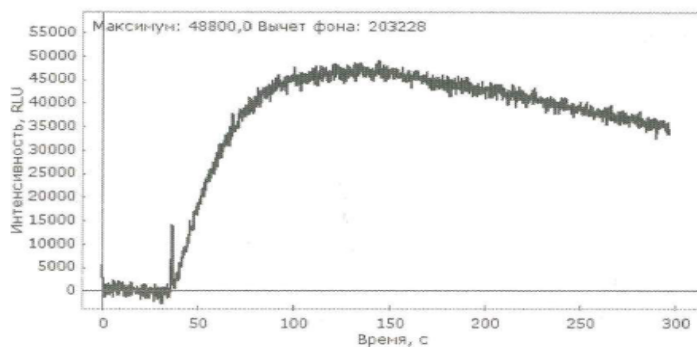


Рисунок 3. Кривая измерений на биолюминометре

9. Повторить измерение дистиллированной воды во второй кювете. Рассчитать  $I_{ср.к}$  - среднее значение максимальной интенсивности свечения в контрольной пробе.

10. В две чистые кюветы пинцетом внести по два диска реагента энзимолум, добавить 300 мкл растаявшего снега в самом высоком разведении (50 раз).

11. Начать измерение, нажав на старт, через 5-10 с нажать «Вычисть фон».

12. Добавить в кювету 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN. Кювету поместить в биолюминометр, закрыть крышку прибора и зарегистрировать максимальную интенсивность свечения реагента в опытной пробе  $I_0$  (в течение 2 мин).

13. Повторить измерение во второй кювете. Рассчитать  $I_{ср.о}$  – среднее значение максимальной интенсивности свечения в опытной пробе.

14. Для опытной пробы рассчитать люциферазный индекс токсичности (ЛИТ, %) по формуле:

$$ЛИТ = \frac{(I_{ср.к} - I_{ср.о})}{I_0} \cdot 100 \%$$

15. Провести аналогичные измерения для разведений снега 1:10, 1:2 и без разведения. Данные занести в таблицу 7.

Таблица 7

Результаты измерений

Кратность разбавления пробы	$I_1$	$I_2$	$I_{ср.}$	ЛИТ
Контроль				
1				
2				
10				
50				

16. Определить токсичность снега по схеме:

Соответствие кратности разбавления тестируемой пробы воды или почвы и токсикологических характеристик качества тестируемой пробы.

17. Сделать заключение об уровне токсичности исследуемой пробы, по данным таблицы 8.

Таблица 8

Токсикологическая характеристика качества пробы

Кратность разбавления тестируемой пробы	Токсикологические характеристики качества тестируемой пробы
1	Нетоксичная
2	Слаботоксичная
От 3 до 10	Токсичная
От 11 до 50	Сильнотоксичная
>50	Гипертоксичная

*Контрольные задания*

*Задача 1.* Установите правильную последовательность стадий и операций технологического процесса. Какая стадия в представленном списке повторяется?

1. Подготовка и стерилизация субстрата.
2. Культивирование биообъекта.
3. Ультразвуковая дезинтеграция клеток.
4. Подготовка и стерилизация оборудования и коммуникаций.
5. Очистка целевого продукта.
6. Анализ целевого продукта.
7. Подготовка посевного материала.
8. Фасовка, упаковка, маркировка лекарственной субстанции.
9. Разделение культуральной суспензии.
10. Биологическая очистка отходов.
11. Выделение целевого продукта.

*Задача 2.* Объектами биотехнологии являются:

- 1) клетки высших растений;
- 2) клетки животных и человека;
- 3) зубактерии;
- 4) галобактерии;
- 5) метаногены;
- 6) грибы (актиномицеты, плесневые грибы, дрожжи).

Какие еще организмы могут являться объектами биотехнологии? Где они могут использоваться?

*Задача 3.* В биотехнологии существует два метода культивирования микроорганизмов: периодический и непрерывный. Напишите преимущества каждого из методов. Предположите, какое биотехнологическое производство можно проводить сочетанием этих методов.

**Задача 4.** Найдите соответствие:

Группы методов дезинтеграции	Методы
1. Физические	А. Ультразвук
2. Химические	Б. Применение ферментов, разрушающих клеточную стенку
	Декомпрессия
	Разрушение толуолом
	Экструдирование клеток под высоким давлением
	Разрушение детергентами

**Задача 5.** Дайте краткую характеристику поверхностному и глубинному методам культивирования микроорганизмов. Какой из методов технически более совершенен - поверхностный или глубинный? Почему? Для чего при глубинном методе осуществляют концентрирование фильтрата перед его выделением?

**Задача 6.** Для решения проблем рентабельности производства, его экологичности, управляемости производственным процессом, повышения качества получаемых продуктов используют иммобилизацию микроорганизмов и растительных клеток или их ферментов. Опишите суть метода. Укажите его преимущества.

**Задача 7.** Какие микроорганизмы используются в качестве продуцентов при получении генно-инженерного инсулина? Почему ферментационные среды должны содержать лактозу и галактозу?

**Задача 8.** В качестве продуцента рекомбинантного человеческого инсулина используют также пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Какими преимуществами они обладают перед другими изученными и культивируемыми в промышленном масштабе микроорганизмами?

**Задача 9.** Природный штамм микроорганизмов в отличие от промышленного продуцента малоэффективен. С помощью, каких методов можно получить промышленный штамм микроорганизмов? Дайте их краткую характеристику.

**Задача 10.** Известно, что многие ценные лекарственные растения нельзя культивировать в России из-за климатических условий. Предложите возможности решения этой проблемы с помощью биотехнологии.

**Задача 11.** Что такое явление тотипотентности? Каково значение этого явления для получения биотехнологических продуктов растительного происхождения?

**Задача 12.** Известно, что некоторые заболевания (как наследственные, так и ненаследственные) могут быть связаны не с дефицитом конкретного белка или с его дефектом, а наоборот, с гиперпродукцией продуктов нормального функционально активного белка. Отсюда следует задача частичного или полного подавления продукции такого белка. Иначе говоря, необходимо избирательно подавлять

экспрессию гена, кодирующего этот белок, или гена фермента, участвующего в посттрансляционной модификации данного белка и превращении в активную форму.

В соответствии с этим выдвинута концепция создания инновационных лекарственных средств, получивших общее название «антисмысловые олигонуклеотиды». Что такое антисмысловые олигонуклеотиды? Как их получают. Какие трудности возникают при их использовании?

*Задача 13.* На фармацевтическом рынке присутствуют диагностические тесты на основе моноклональных антител. Что это такое? Как их получают?

*Задача 14.* Предложите инновационный способ очистки сточных вод с помощью биотехнологического производства.

*Задача 15.* Проблема безопасности биотехнологического производства требует соблюдения определенных условий. Какие условия на физическом и генетическом уровне гарантируют безопасность работы со штаммом-продуцентом?

*Задача 16.* В процессе биосинтеза антибиотика из группы аминогликозидов при культивировании продуцента состав питательной среды включал соевую муку, кукурузный экстракт, повышающий эффективность ферментации и соли. Подача газового потока, источники фосфатов и азота соответствовали требованиям. При добавлении в среду некоторого количества глюкозы биосинтез был ослаблен.

1. В результате чего добавление в среду глюкозы снизило эффективность биосинтеза антибиотика? Какое название носит данный эффект, его сущность?

2. Какие общие закономерности необходимо учитывать при культивировании большинства продуцентов вторичных метаболитов?

3. Какие углеводороды наиболее благоприятны для биосинтеза антибиотиков?

*Задача 17.* Стадия ферментации - центральная среди этапов промышленного производства. Под ферментацией понимают всю совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную среду инокулята до завершения процессов роста, биосинтеза или биотрансформации.

1. Какие два вида ферментации Вам известны?

2. С помощью какого оборудования осуществляется ферментация? Его основные элементы, схематическое изображение.

3. Как технологическое оформление процессов промышленной биотехнологии зависит от отношения микроорганизма-продуцента к кислороду?

4. Три группы биореакторов.

5. Способы управления процессом ферментации.

*Задача 18.* Установите правильную последовательность стадий и операций технологического процесса, представленных на схеме, заполните недостающие операции стадии «Выделение целевого продукта». Предложите методы и аппаратное оснащение операции «Дезинтеграция клеток».

- Подготовка и стерилизация газового потока
- Подготовка и стерилизация оборудования и коммуникаций
- Подготовка и стерилизация субстрата

- Разделение культуральной суспензии
- Обработка культуральной суспензии
- Анализ целевого продукта
- Дезинтеграция клеток
- Выделение индивидуального вещества
- Культивирование биообъекта
- Подготовка биообъекта
- Сушка целевого продукта
- Фасовка, упаковка, маркировка лекарственной субстанции
- Выделение целевого продукта
- Биологическая очистка отходов

*Задача 19.* Ферменты - биологические катализаторы биохимических реакций в живых клетках.

1. Назовите основные свойства ферментов, сравните со свойствами небιологических катализаторов.
2. Активный и аллостерический центр фермента.
3. Биообъекты-биокатализаторы.
4. Классификация ферментов и катализируемых реакций.

*Задача 20.* Фермент липаза почти не синтезируется грибом *Asp. awamori* на среде без индуктора, добавление жира кашалота усиливает биосинтез фермента в сотни раз. При добавлении же в среду крахмала и при полном исключении минерального фосфора интенсивно синтезируется фосфатаза.

1. Какие факторы, влияющие на биосинтез ферментов, Вы знаете?
2. Что произойдет при биосинтезе альфа-амилазы культурой *Asp. oryzae* в случае замены сахарозы (как источника углерода) на крахмал, добавления солодового экстракта (из проросших семян злаковых), или при повышении концентрации основных элементов питательной среды на 50 %?
3. Какими двумя способами может быть определен оптимальный состав питательной среды для каждого продуцента?
4. Каким образом и для чего принято определять активность ферментного препарата?
5. Какой класс ферментов зависимости от катализируемых реакций составляет основную часть среди ферментов, получаемых промышленным способом?

*Задача 21.* Поверхностный метод культивирования продуцентов ферментов.

- А) При поверхностном методе культура растет на поверхности твердой или жидкой питательной среде? За счет чего обеспечивается аэрация при этом способе?
- Б). Основные преимущества поверхностной культуры.
- В). Виды посевного материала при поверхностном культивировании продуцентов ферментов.
- Г). Схема очистки при поверхностном культивировании продуцентов ферментов.
- Д). Стандартизация ферментного препарата, определение.

*Задача 22.* Рассмотрим процесс биотрансформации дигитоксина в дигоксин за счет дегидроксилирования углерода-12.

1. Применяются ли при этом иммобилизованные ферменты?
2. Биообъект - биокатализатор, источники получения.
3. Цели и преимущества использования иммобилизованных клеток растений в качестве биокатализатора в данном процессе.
4. Реакции, катализируемые биокатализатором.
5. Носители для иммобилизации. Методы иммобилизации биокатализатора.
6. Виды биореакторов для процесса с применением иммобилизованного биокатализатора.

*Задача 23.* Ферменты - вещества белковой природы и поэтому неустойчивы при хранении. Кроме того, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от реагентов и продуктов реакции. В 1916 году Дж. Нельсон и Е. Гриффин адсорбировали на угле инвертазу и показали, что она сохраняет в таком виде каталитическую активность. Изобретение какого процесса воздействия на ферменты с целью повышения их устойчивости и возможности многократного применения произошло в 1916 г.?

1. Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными.
2. Основные требования к носителям для получения иммобилизованных ферментов.
3. Классификация носителей для получения иммобилизованных ферментов.
4. Перечислите наиболее распространенные носители из класса углеводов, известные вам.
5. Назовите основные достоинства и недостатки белков в качестве носителей для иммобилизации ферментов, наиболее часто применяемые с этой целью белки.

*Задача 24.* Ощутимый вклад процессы иммобилизации ферментов и клеток внесли в тонкий органический синтез, в анализ, в медицину, в процессы конверсии энергии, в пищевую и фармацевтическую промышленности.

1. Общие направления и достижения применения иммобилизованных ферментов в пищевой промышленности.
2. Общие направления и достижения применения иммобилизованных ферментов в медицине.
3. Преимущества иммобилизованных клеток перед иммобилизованными ферментами, перед свободными клетками.
4. Какие клетки подходят для иммобилизации? Одностадийные и полиферментные реакции.
5. Химические и физические методы иммобилизации клеток, возможности применения.

*Задача 25.* Генная инженерия появилась благодаря работам многих исследователей в разных отраслях биохимии и молекулярной генетики. Генная инженерия - совокупность методов, позволяющих в пробирке переносить генетическую информацию из одного организма в другой. Перенос генов даёт возможность преодолевать межвидовые



барьеры и передавать отдельные наследственные признаки одних организмов другим. Цель - получение клеток, в промышленных масштабах нарабатывать некоторые белки.

1. Что представляют из себя плазмиды, их роль в генной инженерии.
2. Для чего бактериальные клетки вырабатывают рестриктазы?
3. Сущность процесса клонирования для получения рекомбинантной ДНК с применением плазмид и рестриктаз.
4. Основные продуценты, используемые в построении рекомбинантных белков.
5. Понятие вектора в генной инженерии.

*Задача 26.* Важной составной частью биотехнологии является генетическая инженерия. Методы генной инженерии преобразуют клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих в "фабрики" для масштабного производства любого рекомбинантного белка.

1. Дайте определение рекомбинантной ДНК.
2. Какие вы знаете ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК?
3. Особенности контроля качества генно-инженерных препаратов, показатели качества.
4. Роль вектора в генной инженерии.
5. Характеристики векторных систем, важные для переноса необходимых генов в клетки млекопитающих.

*Задача 27.* Культивируемые клетки высших растений могут рассматриваться как типичные микрообъекты. В основе культивирования растительных клеток лежит свойство, благодаря которому соматические клетки растения способны полностью реализовать наследственную информацию, то есть обеспечить развитие всего растения.

1. Какое название носит данное свойство растительных клеток?
2. Какие циклы развития проходит каллусная клетка за весь период своей жизнедеятельности? Кривая роста и фазы роста каллусной ткани.
3. Протопласт - это клетка, лишенная оболочки. Способна ли она к делению?
4. При получении каллусных культур сначала готовят маленькие (2-4 мм) кусочки растительной ткани, не утратившие способность к репродукции. Их название. Этапы получения первичного каллуса.

*Задача 28.* Культуры клеток и тканей для массового размножения растений и оздоровления посадочного материала, в том числе лекарственных растений, нашли широкое применение в растениеводстве.

1. Какой метод позволяет от одной меристемы получить (регенерировать) достаточно большое количество новых растений, в том числе и в культуре *in vitro*?
2. Для осуществления данного метода более подходят слабо дифференцированные или высоко дифференцированные ткани растения?
3. Каллусная ткань, определение, биологическая роль.

4. В качестве чего при культивировании растительных клеток используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), альфа-нафтилуксусную кислоту (НУК)?
5. Какими в зависимости от происхождения и условий выращивания каллусные ткани бывают по степени плотности?

*Задача 29.* Суспензионные культуры широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма, индукции ферментов и экспрессии генов, деградации чужеродных соединений, цитологических исследований и др.

1. Дайте определение суспензионной культуры.
2. Сравните каллусные и суспензионные культуры, указав достоинства и недостатки для биотехнологии.
3. Способ получения суспензионной культуры из каллусной ткани.
4. Культивирование суспензионной культуры в биореакторах. Виды биореакторов по типу перемешивания.
5. Режимы культивирования растительных клеток в промышленности.
6. Предназначение фитогормонов, механизм действия.

*Задача 30.* Определите лекарственную субстанцию по описанию технологического процесса: «Штамм сконструирован методом геной инженерии. Отбор высокопродуктивных клонов проведен по устойчивости к аналогу целевого продукта. В качестве аналога использован розеофлавин. Сверхпродуцент культивируют на питательной среде с мелассой и дрожжевым экстрактом в течение 25-35 ч при температуре 37 °С в условиях аэрации. Целевой продукт секретируется в культуральную жидкость в количестве 3,4-4,0 г/л целевого продукта. Лекарственную субстанцию выделяют из культуральной жидкости по растворимости в щелочах и кислотах и низкой растворимости в органических жидкостях.

1. Составьте технологическую схему получения данного соединения.
2. Метод совершенствования выбранного продуцента и отбора сверхпродуцента.
3. Какие еще продуценты данного вещества вам известны, их достоинства и недостатки.

*Задача 31.* Данный витамин является активным гемопозитическим фактором млекопитающих и ростовым фактором многих микроорганизмов, состоит из двух циклических структур и линейного участка. В молекуле данного витамина металл кобальт связан с первым макроциклом (корриновое ядро). Вторая кольцевая структура - 5,6-диметилбензимидазол (5,6-ДМБ), связанная с первой кольцевой структурой гетерогенной боковой цепью, состоящей из изопропанола, связанного с основанием 5,6- ДМБ М-гликозидной связью.

1. О каком витамине идет речь?
2. Используются ли в производстве данного витамина дрожжи и мицелиарные грибы?
3. Какие продуценты данного витамина вам известны?

4. Метод совершенствования биообъекта и метод отбора сверхпродуцента для получения данного витамина с помощью *Propionibacterium freudenreichii* и *Propionibacterium shermanii*.
5. Методы экстракции и очистки целевого продукта при получении данного витамина с помощью *Propionibacterium freudenreichii* и *Propionibacterium shermanii*.

**Задача 32.** В клетках микроорганизмов рода *Corynebacterium* и *Brevibacterium* в процессе микробиологического синтеза из аспарагиновой кислоты в синтезируется три аминокислоты, в том числе лизин, имеющий промышленное значение.

1. Биообъект для данного процесса.
2. Какие еще аминокислоты образуются в клетках микроорганизмов рода *Corynebacterium* и *Brevibacterium* из аспарагиновой кислоты наряду с лизином?
3. Какой фермент открывает данный метаболический путь, особенности данного фермента. Понятие «совместное ингибирование».
4. Метод совершенствования биообъекта, применяемый при синтезе лизина. Понятия мутанты первого и второго типов, их предназначение и использование их особенностей.

**Задача 33.** В процессе микробиологического синтеза с применением кишечной палочки получают аминокислоту треонин.

1. Биообъект, его особенности при регуляции биосинтеза аминокислот.
2. Строение регуляторной области.
3. Методы совершенствования биообъекта.
4. Метод отбора сверхпродуцента.

**Задача 34.** При взаимоотношениях аэробных бактерий и фотосинтезирующих водорослей наблюдаем следующее - бактерии утилизируют  $O_2$  и углеводы, выделяя  $CO_2$  и факторы роста; водоросли используя квант света превращают  $CO_2$  в  $O_2$  и углеводы.

1. Определите вид данного взаимоотношения.
2. Определение данного вида взаимодействия между микроорганизмами.
3. Как называют такое взаимодействие, когда ни один из штаммов не может быть без взаимодействия с другим?
4. Что понимают под комменсализмом?
5. Сущность амменсализма.

**Задача 35.** Культуры клеток и тканей для массового размножения растений и оздоровления посадочного материала, в том числе лекарственных растений, нашли широкое применение в растениеводстве.

1. С какой целью при выращивании каллусной ткани проводят пассирование или субкультивирование?
2. Понятие и сущность дифференциации меристематической клетки.
3. Может ли у растений процесс дифференциации быть обратимым, при каких условиях.

**Задача 36.** Определите лекарственную субстанцию по описанию технологического процесса, назовите продуцент и метод его совершенствования, методы выделения и очистки, способ сушки лекарственной субстанции:

« ... продуцент *Bacillus polimyxa* обработан многократно рентгеновскими и ультрафиолетовыми лучами, а также азотсодержащими веществами с селекцией на каждом этапе. Сверхпродуцент помещен в ферментатор на жидкую питательную среду, содержащую крахмал, соевую муку, кукурузный экстракт, минеральные соли. После завершения процесса культивирования целевой продукт извлечен из культуральной жидкости и очищен методом ионообменной хроматографии. Целевой продукт высушен распылительной сушкой. Выпускается в таблетках по 500 000 ЕД».

1. Для чего стремятся получить сверхпродуцент?
2. Их свойства, особенности хранения.
3. Необходимо ли учитывать требования GMP при биосинтезе антибиотиков?

**Задача 37.** В общем виде система биотехнологического производства продуктов микробного синтеза представлена на рисунке 4.

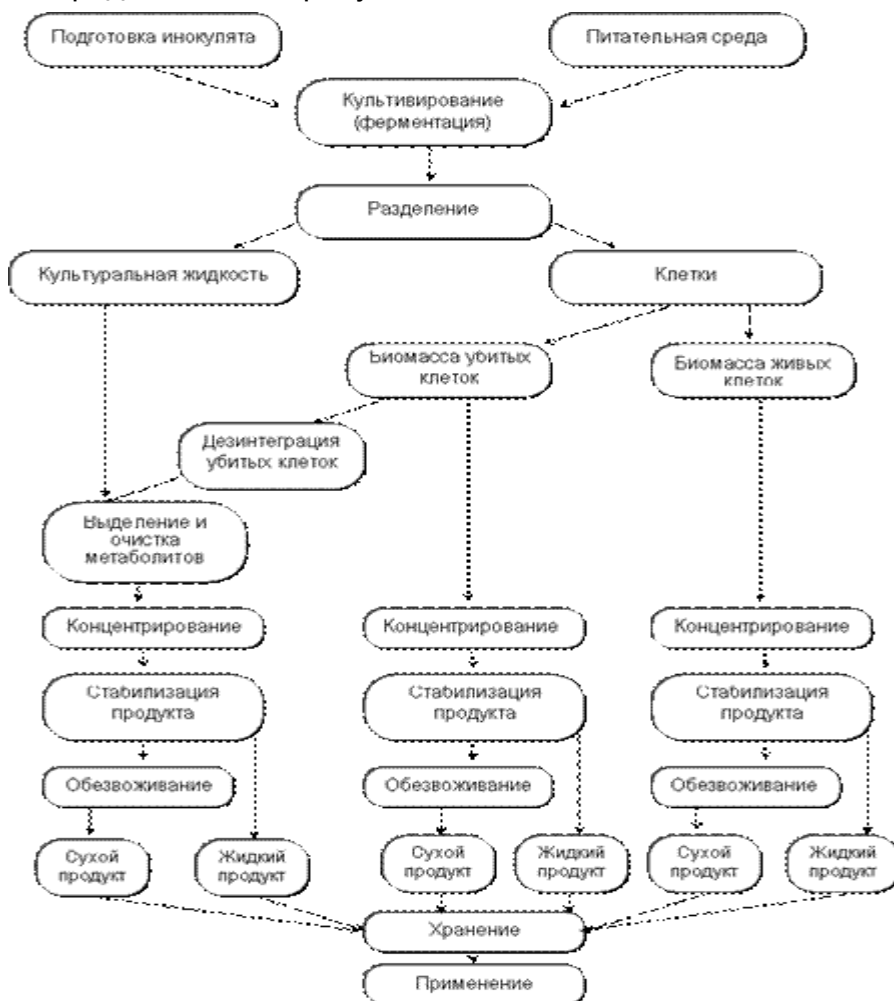


Рисунок 4. Схема микробного синтеза

1. Сколько стадий биотехнологического производства Вы знаете? Назовите их и охарактеризуйте происходящие в них процессы.
2. Расскажите о технологии приготовления питательных сред для

микробиологического синтеза вещества. Что входит в состав питательной среды? Особенности введения в среду источников углерода.

3. Асептика при приготовлении питательной среды в процессе микробиологического синтеза. Стерилизация газовых и жидкостных потоков. Требования к химическим антисептикам.

4. Требуется ли стерилизации среда, в которой субстратами служат метанол, этанол или концентрированная уксусная кислота?

5. Как достигается соблюдение асептики в данном случае?

6. Поддержание чистой культуры и получение засевной дозы. Отделение чистой культуры. Особенности при периодическом процессе культивирования и при непрерывном

*Задача 38.* Продукты микробного синтеза поступают из биореактора в виде водных суспензий или растворов, при этом характерно невысокое содержание основного компонента и наличие многих примесных веществ. В большинстве промышленных производств на первом этапе переработки культуральной жидкости производят отделение массы продуцента от жидкой фазы – сепарацию.

1. Как технологические приемы, используемые для отделения клеток от среды, зависят от природы продуцента?

2. Поясните на примере сравнении выделения продуцента у сахаромицетов и дрожжей рода *Candida*.

3. Роль фильтрации и центрифугирования при отделении твердой фазы.

4. Какие способы обработки культуральной жидкости вам известны?

*Задача 39.* Глубинный метод культивирования продуцентов ферментов.

1. При глубинном методе культура растет на поверхности твердой или в жидкой питательной среде?

2. Какой из методов технически более совершенен - поверхностный или глубинный, почему?

3. Для чего при глубинном методе осуществляют концентрирование фильтрата перед его выделением?

4. Этапы при глубинном культивировании продуцентов ферментов. Сущность каждого этапа.

*Задача 40.* Какие два основных метода иммобилизации ферментов Вы знаете?

1. Какие два основных способа для иммобилизации ферментов в геле вам известны?

2. В чем заключается принцип иммобилизации ферментов с использованием мембран? Микрокапсулирование. Включение в волокна и включение в липосомы.

3. Метод иммобилизации ферментов с использованием систем двухфазного

типа.

4. Методы химической иммобилизации, отличия от физической иммобилизации.

*Задача 41.* Продукты микробного синтеза поступают из биореактора в виде водных суспензий или растворов, при этом характерно невысокое содержание основного компонента и наличие многих примесных веществ. В большинстве промышленных производств на первом этапе переработки культуральной жидкости производят отделение массы продуцента от жидкой фазы – сепарацию.

1. Как называют способ выделения и очистки продуктов, находящихся внутри клеток продуцента?

2. Какие способы освобождения от растворимых веществ вам известны?

3. Перечислите известные вам методы тонкой очистки и разделения препаратов.

*Задача 42.* Создание и производство рекомбинантных человеческих инсулинов существенно повысило эффективность лечения сахарного диабета и обеспечило повышение качества жизни больных.

1. Методы очистки полученных рекомбинантных белков- предшественников цепей **A** и **B** в биотехнологическом производстве инсулина по технологии фирмы «Eli Lilly»?

2. Процесс выделения **A** и **B** цепей, их соединение в молекулу инсулина.

3. Недостатки метода и продуцента при производстве инсулина по технологии фирмы «Eli Lilly».

4. Технологические приемы, используемые для защиты персонала, производственного процесса, отходов и окружающей среды от контаминации клетками *Escherichia coli*.

5. Перечислите препараты рекомбинантного инсулина, выпускаемого по технологии фирмы «Eli Lilly».

*Задача 43.* В качестве продуцента рекомбинантного человеческого инсулина используют также пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, так как они обладают рядом преимуществ перед другими изученными и культивируемыми в промышленном масштабе микроорганизмами.

1. Достоинства пекарских дрожжей как продуцента рекомбинантных белков.

2. Какая фирма применяет пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* в качестве продуцента рекомбинантного человеческого инсулина?

3. Препараты инсулина, полученного благодаря методам генетической инженерии с использованием *Saccharomyces cerevisiae*, на фармацевтическом рынке России.

*Задача 44.* В качестве продуцента рекомбинантного человеческого инсулина используют также пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, так как они обладают рядом преимуществ перед другими изученными и культивируемыми в промышленном масштабе микроорганизмами.

1. Тип нуклеиновой кислоты, применяемой для переноса в геном (построения вектора), в производстве рекомбинантного инсулина, источник ее получения.

2. Селекцию трансформированных сахаромикетов при производстве рекомбинантного инсулина проводят на питательной среде, не содержащей аминокислоты лейцин. Почему?

3. Метод культивирования продуцента *Saccharomyces cerevisiae* при производстве рекомбинантного инсулина.

4. Культуральную суспензию *Saccharomyces cerevisiae* разделяют центрифугированием, целевой продукт выделяют из культуральной жидкости и очищают методами ионообменной и гель-хроматографии. Далее его подвергают биоконверсии по реакции транспептидации, используя трипсин и бета-карбокисептидазу. С какой целью производится реакция транспептидации?

*Задача 45.* Суспензионные культуры - отдельные клетки или группы клеток, выращиваемые во взвешенном состоянии в жидкой среде. Представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, которую легко подвергнуть воздействию химических веществ. Суспензионные культуры широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма, индукции ферментов и экспрессии генов, деградации чужеродных соединений, цитологических исследований и др.

1. Получение суспензионной культуры из каллусной ткани.

2. Фазы роста суспензионной культуры.

3. Какие два вида систем культивирования при глубинном культивировании растительных клеток применяют?

*Задача 46.* Суспензионные культуры - отдельные клетки или группы клеток, выращиваемые во взвешенном состоянии в жидкой среде. Представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, которую легко подвергнуть воздействию химических веществ. Суспензионные культуры широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма, индукции ферментов и экспрессии генов, деградации чужеродных соединений, цитологических исследований и др.

1. Накопление вторичных метаболитов возрастает в фазе замедленного роста клеточной популяции, а в стационарной фазе?

2. Как влияют на синтез вторичных метаболитов стрессовые условия, воздействующие на клетки в конце экспоненциальной фазы?

3. Использование суспензионных культур в промышленности. Примеры растений, применяемых в медицине для создания лекарственных препаратов.

*Задача 47.* Существуют технологии получения вторичных метаболитов с помощью иммобилизованных клеток каллусной культуры (в частности, такие системы, используются для иммобилизации каллусной культуры клеток *Digitalis lanata*).

1. Носители для иммобилизации клеток растений.
2. Способны ли иммобилизованные клетки расти?
3. Преимущества иммобилизованных клеток растений по сравнению с суспензионными культурами.
4. Процесс получения дигоксина из дигитоксина, применяемый продуцент, сущность процесса биотрансформации.

*Задача 48.* Данный биопродукт из культуры изолированных клеток разработан в лаборатории культуры тканей Института физиологии растений РАН на основе высокопродуктивного клеточного штамма культуры растительных клеток и используется для изготовления лосьонов, кремов, а также тонизирующих препаратов. Экстракт из клеток данного растения обладает радиопротекторным, иммуностимулирующим и другими эффектами.

1. О клетках какого растения идет речь?
2. Показания к применению.

*Задача 49.* Известно, что провитамин D<sub>2</sub> (эргостерин) продуцируют дрожжи - сахаромицеты в аэробных условиях при избытке углеводов в питательной среде, сниженном количестве азота и оптимальном содержании кислорода (максимум 2 %).

1. Назовите промышленный продуцент для провитамина D<sub>2</sub>.
2. Необходим ли УФ-свет для процесса образования целевого продукта?  
Если да, то для чего, и на каком этапе технологического процесса.
3. Для чего в промышленном производстве витамина D<sub>2</sub> применяют гидролиз?
4. Как используют полученный гидролизат?
5. Как используют грибы рода *Candida* в качестве продуцента D<sub>2</sub>?
6. Какие коферменты можно получить с использованием грибов рода *Candida* в качестве продуцента D<sub>2</sub>? Роль в организме данных веществ.

*Задача 50.* Процесс промышленного производства данного витамина осуществляется в виде нескольких стадий, лишь одна из которых является биотехнологической, остальные - химические превращения. По химическим свойствам данный витамин является L-кислотой. Исходным веществом для промышленного производства служит крахмал.

1. Что за витамин производится подобным способом? Название метода промышленного производства.
2. Перечислите стадии производства, отметьте среди них



биотехнологическую.

3. Продуценты биотехнологической стадии, их особенности.

4. Что вам известно о синтезе предшественника данного витамина - гидрат диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты - какой микроорганизм может использоваться для синтеза данного вещества - предшественника, метод его совершенствования?

*Задача 51.* Из изолимонной кислоты цикла Кребса при культивировании бактерий родов *Corynebacterium* и *Brevibacterium* на углеводном сырье (гидролизат крахмала, тростниковая или свекловичная меласса) в условиях при дефиците биотина с подавлением активности фермента глутаматдегидрогеназы синтезируется.

1. Предшественником каких других аминокислот является полученное вещество?

2. Метаболический предшественник при биосинтезе данной аминокислоты.

3. Что ожидается при высоком содержании в питательной среде биотина и солей аммония при культивировании бактерий родов *Corynebacterium* и *Brevibacterium* на углеводном сырье.

4. Схематически изобразите данный процесс.

*Задача 52.* Большинство препаратов пробиотиков представляют собой биомассу микроорганизмов.

1. Какие этапы включает процесс получения продуцента для препаратов нормофлоры?

2. Продуцент при получении колибактерина.

3. Каким образом продуцент - кишечную палочку, восстанавливают из состояния анабиоза?

4. Перечислите оптимальные условия для культивирования кишечной палочки с целью накопления биомассы.

5. Контроль препарата колибактерина.

*Задача 53.* Технология производства препаратов бифидо - и лактобактерии аналогична технологии колибактерина. Различия относятся к составу питательных сред и условиям культивирования в соответствии с физиологическими особенностями бактерий.

1. Какими преимуществами обладают бифидо - и лактобактерии для производства и применения в качестве лекарственных препаратов по сравнению с кишечной палочкой?

2. Какие стадии присутствуют в технологическом процессе производства препаратов пробиотиков?

3. По каким показателям проводят контроль готового лекарственного препарата *Bifidobacterium bifidum*?

4. Какой способ производственного культивирования в биореакторе

предпочтительнее для накопления биомассы молочнокислых бактерий.

5. По каким показателям осуществляют контроль лекарственного препарата «Лактобактерин»?

*Задача 54.* Стероидные гормоны (кортикостероиды, прогестогены, половые гормоны) участвуют во многих жизненно важных функциях организма. В основе получения стероидных гормонов лежат методы биотрансформации (биоконверсии).

1. Сущность процесса биотрансформации.
2. Каким образом осуществляется синтез молекулы стероида в процессе биоконверсии?
3. Основные процессы микробиологической трансформации.
4. Преимущества биотехнологических методов производства стероидов перед методами химического синтеза.
5. Что используется в качестве исходного сырья для производства стероидных препаратов в биотехнологическом производстве?
6. Какой тип ферментации применяют при биотрансформации стероидов?
7. Трансформация может осуществляться как растущей на среде культурой, так и отмытыми от питательной среды клетками микроорганизма. Какой из вариантов предпочтительнее, есть ли исключения?

*Задача 55.* В настоящее время возможности и достоинства использования биотрансформации проявились наиболее ярко в области превращений стероидных соединений. Сложность молекул стероидов затрудняет даже незначительные их модификации химическим путем.

1. В процессе промышленного производства стероидов необходимым условием является высокая степень предварительного измельчения стероидного субстрата. С какой целью и чем это обусловлено?
2. Методы, повышающие водорастворимость стероидов, когда растворимость стероидного субстрата слишком мала для проявления присущей микроорганизму ферментативной активности.
3. Что представляет собой «вещество S», его применение.

*Задача 56.* Главным препятствием, стоящим на пути развития промышленного микробиологического гидроксирования стероидов является низкая производительность ферментации, несмотря на высокий процентный выход по субстрату.

1. Причины низкой производительности ферментации при микробиологическом гидроксировании стероидов.
2. Актинобактерии, роль в процессах биоконверсии стероидов.
3. Род *Corynebacterium*, роль в процессах биоконверсии стероидов.

## Список литературы

### *Основная литература*

1. Антипова Л.В. Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции.– М.: Юрайт, 2020. 204 с.
2. Беккер М.Е. Введение в биотехнологию /М.Е. Беккер. – М.: Книга по Требованию, 2012. 115 с.
3. Дебабов В.Г. Биотехнология. В 8 книгах. Книга 2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. Учебное пособие / В.Г. Дебабов, В.А. Лившиц. – М.: Высшая школа, 2013. 208 с.
4. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Биотехнология. В 2 ч. Часть 1: учебник и практикум для вузов / под общей редакцией Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко, 2-е изд., испр. и доп. – М.: Юрайт, 2020. 170 с.
5. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Биотехнология. В 2 ч. Часть 2: учебник и практикум для вузов/ под общей редакцией Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко, 2-е изд., испр. и доп.– М.:Юрайт, 2020. 219 с.
6. Загоскина Н.В. Биотехнология Теория и практика.– М.:Оникс, 2014. 496 с.
7. Клунова С. М. Биотехнология : учеб. для вузов / С. М. Клунова, Т. А. Егорова, Е. А. Живухина. - М.: Академия, 2010. 255 с.
8. Назаренко Л.В., Долгих Ю.И. Биотехнология растений: учебник и практикум для вузов, 2-е изд., испр. и доп.– М.: Юрайт, 2020. 161 с.
9. Неверова О. А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения/ О. А. Неверова, Г. А. Гореликова, В. М. Позняковский. -Новосибирск: Сиб. университет. изд-во, 2007. 416 с.
10. Сазыкин Ю. О. Биотехнология : учеб. пособие для вузов/ Ю. О. Сазыкин.- 3-еизд., стер. - М.: Академия, 2008. 256 с.
11. Чечина О.Н. Общая биотехнология: учебное пособие для вузов/ О.Н. Чечина, 2-е изд., перераб. и доп. М.: Юрайт, 2020. 231 с.
12. Чечина О.Н. Сельскохозяйственная биотехнология:– 3-е изд., перераб. и доп.– М.: Юрайт, 2021. 266 с.
13. Шмид Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия / Р. Шмид. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014. 328 с.

### *Дополнительная литература*

14. Волова Т. Г. Экологическая биотехнология : учеб. пособие для ун-тов / Т. Г. Волова. - Новосибирск: Сиб. хронограф, 1997. -141 с.
15. Глик Б. Молекулярная биотехнология: принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак; под ред. Н. К. Янковского; пер. с англ. Н. В. Баскакова [и др.]. - М.: Мир, 2002. - 589 с.

16. Иммобилизованные клетки микроорганизмов : учеб. пособие / А. П. Сеницын [и др.]. -М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1994. 288 с.
17. Нетрусов А. И. Микробиология: учеб. для вузов / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. -М.: Академия, 2012. 379 с.
18. Терентьев, В. И. Биотехнология очистки воды: в 2 ч. Ч. 1 / В. И. Терентьев, Н. М. Павловец. -СПб.: Гуманистика, 2003. 270 с.
19. Шугалей В. С. Биотехнология : учеб. пособие для студентов / В. С. Шугалей. - Ростов-н/Д.: РИНЯЗ, 2001. 84 с.

#### *Электронный ресурс*

20. Алешина Е. С. Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса.-Оренбург: Университет, 2017. 192 с. Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/634971>.
21. Каллистова А. Ю. Биотехнология и микробиология анаэробной переработки органических коммунальных отходов.-М.: Университетская книга, 2016. 320 с. Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/590606>.
22. Павлинова И. И. Совершенствование методов биотехнологии в строительстве и эксплуатации систем водоснабжения и водоотведения.-М.: Изд-во МИСИ-МГСУ, 2017. 149 с. Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/702722>.
23. Федоренко В. Ф. Современные технологии производства пестицидов и агрохимикатов биологического происхождения.- М.: ФГБНУ "Росинформагротех", 2018. 128 с. Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/679446>.
24. Рябцева С. А. Общая биология и микробиология. Часть 1. Общая биология: учебное пособие.– Ставрополь: изд-во СКФУ, 2016. 150 с. Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/603356>.

## Приложение

Приложение 1

*Образец оформления реферата (титульный лист, содержание)*

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ  
ЛЕНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. А.С. ПУШКИНА  
Лужский институт (филиал)**

**Кафедра биотехнологии, технологии производства и переработки  
сельскохозяйственной продукции**

**РЕФЕРАТ  
по дисциплине  
Основы биотехнологии**

**Тема: БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОГАЗА**

Обучающийся \_\_\_\_ курса  
очной формы обучения  
направления 19.03.01  
Биотехнология

\_\_\_\_\_  
(подпись)

Фамилия  
Имя Отчество

Преподаватель

\_\_\_\_\_  
(подпись)

Фамилия  
Имя Отчество

Луга  
20 \_\_\_\_ г.

## Содержание

<b>Введение</b>	<b>3</b>
<b>Глава 1. Биотехнология и производство биогаза</b>	<b>5</b>
1.1. Особенности биогазового топлива	8
1.2. Факторы, влияющие на производство биогаза	14
1.3. Стадия гидролиза для получения биогаза	15
<b>Глава 2. Установки для получения биогаза</b>	<b>18</b>
2.1. Производственная схема получения биогаз	22
2.2. Метановое брожение	24
2.3. Системы хранения биогаза и применение	26
<b>Глава 3. Развитие биогазовых технологий в России</b>	<b>32</b>
<b>Заключение</b>	<b>36</b>
<b>Список использованных источников</b>	<b>38</b>
<b>Приложение</b>	<b>39</b>

## Приложение 2

### *План доклада и критерии оценки к практической работе по теме «Биотехнология промышленных производств»*

#### *План доклада:*

1. Селекция штаммов-продуцентов (биотехнологические объекты).
2. Используемые субстраты и аппаратура (из чего и на чем готовят).
3. Основные этапы технологического процесса (как готовят).
4. Выделение продукта, получение коммерческого препарата.

#### *Критерии оценки*

Выступление оценивается преподавателем и студентами по 10-балльной шкале:

- максимум 3 балла, если понятно описаны биотехнологические объекты;
- 3 балла, если представлены все возможные субстраты и аппаратура;
- 3 балла, если четко приведены этапы биотехнологического процесса;
- 1 балл за креативность.

*Методика окрашивания мазков по Граму*

1. Обезжирить чистое предметное стекло.
2. Нанести бактериологической петлей каплю стерильного физраствора на центр предметного стекла.
3. Набрать петлей бактериальную массу и смешать с физраствором на предметном стекле.
4. Высушить мазок на воздухе.
5. Зафиксировать мазок: предметное стекло с препаратом взять пинцетом за ребра мазком кверху и плавными движениями провести 2-3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с.
6. Нанести на фиксированный мазок генцианвиолет, выдержать 3 мин.
7. Слить краску, залить мазок раствором Люголя, выдержать 1 мин.
8. Слить раствор Люголя, нанести 96 % раствор этилового спирта, выдержать 30 с.
9. Промыть тщательно в проточной воде в течение 1 мин.
10. Добавить фуксин, выдержать 2 мин.
11. Промыть препарат водопроводной водой, подсушить фильтровальной бумагой.



## Приложение 4

### *План доклада и критерии оценки к практической работе по теме «Биотехнологии в охране окружающей среды»*

#### *План доклада:*

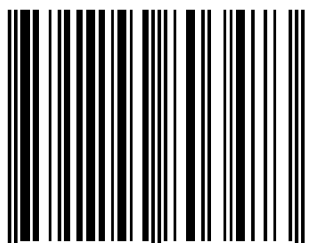
1. Современное состояние проблемы.
2. Имеющиеся на сегодняшний день способы решения проблемы.
3. Ваш альтернативный способ решения проблемы: цель проекта, сроки реализации, этапы выполнения, примерная стоимость (смета), экономическая эффективность.

#### *Критерии оценки*

Выступление оценивается преподавателем и студентами по 10-балльной шкале:

- максимум 3 балла, если понятно описаны имеющиеся на сегодняшний день способы решения проблемы;
- 3 балла, если понятен и интересен предложенный авторами способ решения проблемы;
- 3 балла, если четко рассчитана смета и показана экономическая эффективность проекта;
- 1 балл за креативность.

ISBN 978-1-7948-0347-3



9 781794 803473

Усл. печ. л. 4,3.

Объем издания 2.0 МВ

Оформление электронного издания:

НОО Профессиональная наука, [mail@scipro.ru](mailto:mail@scipro.ru)

Дата размещения: 20.11.2021 г.

URL: <http://scipro.ru/conf/basicsbiotechnology.pdf>