

Міністерство освіти і науки України  
Кам'янець-Подільський національний університет імені Івана Огієнка

**І. Д. ГРИГОРЧУК,  
О. М. ОПТАСЮК**

# **БІОТЕХНОЛОГІЯ З ОСНОВАМИ НАНОТЕХНОЛОГІЇ**

*КУРС ЛЕКЦІЙ*

**НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК**



**ЕЛЕКТРОННЕ ВИДАННЯ**

Кам'янець-Подільський  
2024

УДК 60+620.3](075.8)

ББК 28.087.1+30.600.3я73

Г83

Рекомендувала вчена рада природничо-економічного факультету  
Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка  
(протокол № 1 від 23 січня 2024 року)

### **РЕЦЕНЗЕНТИ:**

**І. В. Федорчук**, кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології та екології

Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка;

**М. І. Козак**, кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології та екології

Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка;

**У. І. Недільська**, кандидат сільськогосподарських наук, доцент,

завідувач кафедри екології і загальнобіологічних дисциплін

Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

**Григорчук І. Д., Оптасюк О. М.**

**Г83 Біотехнологія з основами нанотехнології. Курс лекцій:** навчально-методичний посібник [Електронний ресурс]. Кам'янець-Подільський: Кам'янець-Подільський національний університет імені Івана Огієнка, 2024. 148 с.

**Електронна версія посібника доступна за покликаннями:**

URL: <http://elar.kpnu.edu.ua:8081/xmlui/handle/123456789/7885>

Навчально-методичний посібник «Біотехнологія з основами нанотехнології (курс лекцій)» на сучасному рівні викладає основні теми навчальної дисципліни: основні напрями та перспективи біотехнології, культивування тваринних та рослинних клітин і тканин, генна інженерія, технологічна біоенергетика і біологічні процеси переробки мінеральної сировини, біотехнологія та проблеми захисту навколишнього середовища, нанотехнології та нанобіотехнологія тощо.

Рекомендовано для здобувачів вищої освіти вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації, освітнього рівня «Бакалавр», спеціальностей 091 Біологія, 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини).

УДК 60+620.3](075.8)

ББК 28.087.1+30.600.3я73

© Григорчук І. Д., Оптасюк О. М., 2024

# ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА.....	6
ВСТУП. ОСНОВНІ НАПРЯМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ .....	7
1. Біотехнологія, її мета та основні завдання, місце в системі біологічних дисциплін .....	7
2. Етапи становлення біотехнології .....	10
3. Основні напрями біотехнології. біотехнологія нових матеріалів ...	14
4. Об'єкти біотехнології і їх біотехнологічні функції .....	14
5. Основні складові біотехнологічного процесу .....	16
Контрольні запитання: .....	17
КУЛЬТУРИ ТВАРИННИХ КЛІТИН І ТКАНИН .....	18
1. Культивування клітин. Історія розвитку методу .....	18
2. Використання клітинних культур.....	21
3. Використання культури клітин людини .....	22
4. Основні принципи культивування.....	23
5. Умови культивування клітин та поживні середовища .....	25
6. Гібридизація тваринних клітин.....	29
6.1. Механізм злиття клітин при утворенні гібридних клітин .....	30
6.2. Гібридома. Моноклональні антитіла .....	31
Контрольні запитання.....	33
КУЛЬТУРИ КЛІТИН ВИЩИХ РОСЛИН .....	34
1. Значення, напрями та можливості використання культури ізольованих клітин і тканин рослин .....	34
2. Тотипотентність рослинної клітини .....	36
3. Культура калусних тканин .....	37
3.1. Особливості калусних клітин.....	38
3.2. Морфогенез в калусних тканинах .....	39
4. Суспензійні культури.....	40
5. Культура окремих ізольованих клітин, або культура поодиноких клітин.....	41

6. Умови та методи культивування рослинних клітин і тканин <i>in vitro</i> .....	43
6.1. Склад поживних середовищ і роль їх окремих компонентів....	44
6.2. Стерилізація живильних середовищ .....	44
6.3. Основні вимоги до умов культивування .....	45
7. Протопласти рослинних клітин як об'єкт біологічного конструювання.....	46
7.1. Способи отримання і культивування протопластів.....	46
7.2. Застосування ізольованих протопластів .....	48
7.3. Злиття протопластів (парасексуальна гібридизація) .....	48
8. Мікроклональне розмноження і оздоровлення рослин .....	49
9. Методи збереження генофонду. Методика кріоконсервації, способи уповільнення росту.....	57
Контрольні запитання.....	60
<b>ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ ВВЕДЕННЯ В ГЕНЕТИЧНУ ІНЖЕНЕРІЮ МОЖЛИВОСТІ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ.....</b>	<b>61</b>
1. Поняття генної інженерії.....	61
2. Методи технології рекомбінантних ДНК.....	63
2.1. Ферменти, що використовуються в генній інженерії .....	63
2.2. Визначення нуклеотидної послідовності (секвенування) ДНК.....	64
2.3. Гібридизація як високочутливий метод виявлення специфічних послідовностей нуклеотидів.....	68
2.4. Методи клонування ДНК.....	69
2.5. Введення гена в клітину .....	72
3. Трансгенні рослини і тварини. Перспективи їх використання.....	77
3.1. Области застосування генної інженерії рослин.....	77
3.2. Комерціалізація трансгенних рослин і біобезпека.....	81
3.3. Трансгенні тварини: технології одержання .....	83
3.4. Застосування трансгенних тварин .....	85
4. Генотерапія.....	89
Контрольні запитання.....	93
<b>ТЕХНОЛОГІЧНА БІОНЕРГЕТИКА І БІОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ ПЕРЕРОБКИ МІНЕРАЛЬНОЇ СИРОВИНИ .....</b>	<b>94</b>
1. Біотехнологія у вирішенні енергетичних проблем. отримання біогазу, спирту із промислових і сільськогосподарських відходів....	94

1.1. Біометаногенез .....	96
1.2. Отримання спирту .....	101
1.3. Рідкі вуглеводні .....	104
1.4. Біологічне отримання водню .....	105
2. Біогеотехнологія металів .....	108
3. Використання мікроорганізмів у процесах видобутку корисних копалин.....	110
Контрольні запитання.....	113
<b>БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ПРОБЛЕМИ ЗАХИСТУ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА .....</b>	<b>114</b>
1. Принципи біологічних методів аеробної та анаеробної переробки відходів .....	114
2. Анаеробні процеси очищення стоків .....	116
3. Аеробні процеси очищення стоків .....	117
4. Застосування біотехнологічних методів для очищення газо-повітряних викидів і деградації ксенобіотиків .....	123
Контрольні запитання.....	132
<b>НАНОТЕХНОЛОГІЇ ТА НАНОБІОТЕХНОЛОГІЯ .....</b>	<b>133</b>
1. Нанотехнологія, основні напрями і завдання нанотехнологій.....	133
2. Нанобіологія та нанобіотехнологія .....	136
3. Основні напрямки розвитку нанобіотехнологій.....	137
4. Розвиток нанотехнологій в Україні.....	139
Контрольні запитання.....	146
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>147</b>

## ПЕРЕДМОВА

Біотехнологія – галузь науки і виробництва, що ґрунтується на використанні біологічних процесів і об'єктів для виробництва економічно важливих речовин і створення високопродуктивних сортів рослин, порід тварин і штамів мікроорганізмів.

Навчально-методичний посібник «Біотехнологія з основами нанотехнології (курс лекцій)» на сучасному рівні викладає основні теми навчальної дисципліни: основні напрями та перспективи біотехнології, культивування тваринних та рослинних клітин і тканин, генна інженерія, технологічна біоенергетика і біологічні процеси переробки мінеральної сировини, біотехнологія та проблеми захисту навколишнього середовища, нанотехнології та нанобіотехнологія тощо.

Рекомендовано для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня, спеціальностей 091 Біологія та біохімія, 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини).

Теоретичний матеріал курсу може бути використаний також вчителями та здобувачами освіти закладів загальної середньої освіти в класах з поглибленим вивченням біологічних дисциплін. Лекційний курс розроблено відповідно до змісту навчальної програми з «Біотехнологія з основами нанотехнології», з урахуванням того, що здобувачі вищої освіти засвоїли цитологію та гістологію з основами ембріології, анатомію людини, фізіологію людини та тварини, біохімію, генетику з основами селекції, молекулярну біологію.

Запропонований курс лекцій у значній мірі сприятиме покращенню засвоєння здобувачами вищої освіти теоретичного матеріалу та забезпечить формування належного рівня їхньої професійної компетентності.

# ВСТУП. ОСНОВНІ НАПРЯМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

## ПЛАН

1. Біотехнологія, її мета та основні завдання, місце в системі біологічних дисциплін.
2. Етапи становлення біотехнології.
3. Основні напрями біотехнології. Біотехнологія нових матеріалів.
4. Об'єкти біотехнології і їх біотехнологічні функції.
5. Основні складові біотехнологічного процесу.

## 1. БІОТЕХНОЛОГІЯ, ЇЇ МЕТА ТА ОСНОВНІ ЗАВДАННЯ, МІСЦЕ В СИСТЕМІ БІОЛОГІЧНИХ ДИСЦИПЛІН

Біотехнологія як наука є найважливішим розділом сучасної біології, яка, як і фізика, стала в кінці ХХ ст. одним з провідних пріоритетів в світовій науці і економіці.

Існує багато визначень поняття «біотехнологія» (від лат. *bios* – життя, *technos* – архітектура, мистецтво; *logos* – наука):

*Найбільш повним і правильним буде таке визначення біотехнології:*

**Біотехнологія** – галузь науки і виробництва, що ґрунтується на використанні біологічних процесів і об'єктів для виробництва економічно важливих речовин і створення високопродуктивних сортів рослин, порід тварин і штамів мікроорганізмів.

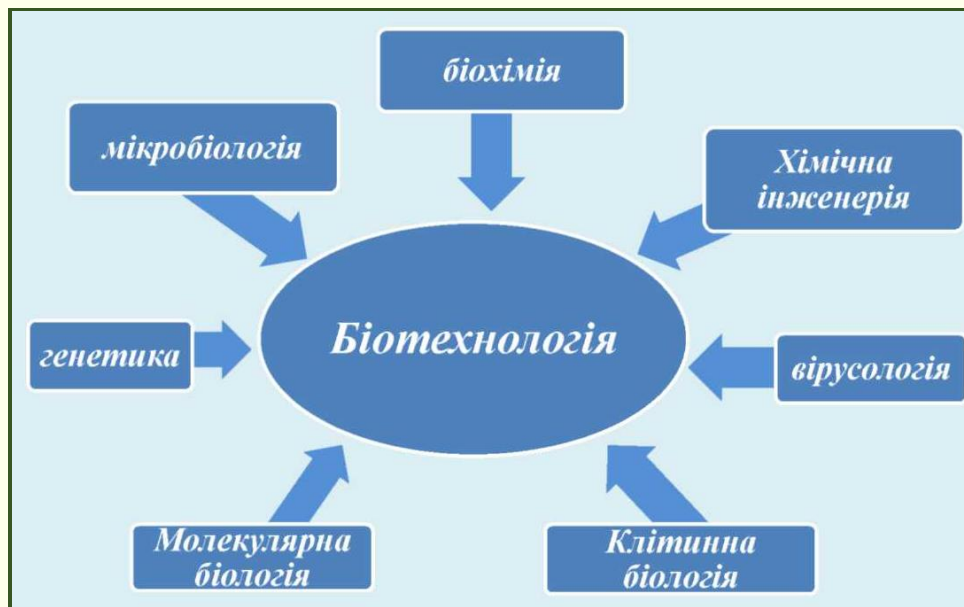
У буквальному розумінні слова біотехнологія – це «біологія + технологія», тобто використання фундаментальних біологічних знань у практичній діяльності, спрямованій на виробництво лікарських препаратів, ферментів, білків, барвників, вітамінів та інших біологічно активних сполук, генетичному конструюванні організмів тощо.

Біотехнологія – одна з найдавніших і водночас одна з наймолодших наук і галузей промисловості.



Вперше термін «**біотехнологія**» застосував угорський інженер Карл Ерекі у 1917 році. (для позначення робіт, в яких продукти одержували за допомогою живих організмів). Однак термін «біотехнологія» прижився лише з середини 70-х років ХХ ст., коли біотехнологія пережила своє друге народження у зв'язку з появою генетичної інженерії. Власне становлення біотехнології як самостійної науки розпочалося з 1972 р., коли П. Берг зі співробітниками у США створили першу рекомбінантну молекулу ДНК.

Сучасна біотехнологія тісно пов'язана з рядом наукових дисциплін, здійснюючи їх практичне застосування або ж будучи їх основним інструментом. Фундаментом біотехнології є мікробіологія, вірусологія, генетика, імунологія, хімічна технологія, біохімія, біофізика, молекулярна біологія (рис. 1).



**Рис. 1.** Зв'язок біотехнології з іншими науками

### **Мета і завдання біотехнології:**

*Першочерговими завданнями біотехнології є створення:*

- нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів для гуманної і ветеринарної медицини (інтерферонів, інсуліну, гормонів росту людини, моноклональних антитіл, вакцин тощо) для ефективної профілактики, діагностики і лікування людей і тварин;
- засобів захисту рослин від хвороб і шкідників; бактеріальних добрив і регуляторів росту рослин; нових високопродуктивних і стійких до несприятливих факторів зовнішнього середовища сортів і гібридів сіль-



ськогосподарських рослин, одержаних методами генетичної і клітинної інженерії;

- цінних кормових добавок і біологічно активних речовин (кормового білка, амінокислот, ферментів, вітамінів тощо) для застосування у тваринництві з метою підвищення продуктивності тварин;
- нових технологій одержання цінних продуктів для використання у харчовій, хімічній, мікробіологічній та інших галузях промисловості;
- безвідходних і екологічно безпечних технологій утилізації і біоконверсії сільськогосподарських, промислових, побутових відходів для одержання енергоносіїв (біогазу), високоякісного органічного добрива, білкових та вітамінних кормових добавок;
- удосконалення і оптимізація апаратури для біотехнологічних процесів з метою досягнення максимальних виходів кінцевих продуктів;
- підвищення техніко-економічних показників біотехнологічних процесів, порівняно з існуючими.

На шляху вирішення поставлених завдань біотехнологію чекають немалі труднощі, пов'язані з виключною складністю організації живого. Будь-який біооб'єкт – це цілісна система, в якій не можна змінити жоден з елементів, не змінюючи інших, не можна довільно перекомбінувати їх. Будь-який вплив на об'єкт викликає не тільки бажані, але й побічні ефекти. Перебудова геному відразу відбивається на багатьох ознаках організму. Окрім цього, екосистема – це свого роду цілісна система, і зміна одного з її компонентів позначається на інших компонентах. Успіхи, досягнуті у сфері генетичної і клітинної інженерії на найпростіших біологічних системах (прокаріотичних організмах), дають надію на подолання цих труднощів.

## 2. ЕТАПИ СТАНОВЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Хоча біотехнологія як окрема наука та галузь виробництва вважається наймолодшою з усіх відомих, її формування відбувалося разом з розвитком людського суспільства.

Серед етапів розвитку біотехнології можна виділити 4, які широко розкривають сутність становлення цієї науки.

**Перший період**, як і у всіх інших наук – це *емпіричний* період (від грец. «*emperikos*» – дослідний) або доісторичний – найдовший (6000 р. до н.е. + 2000 р. н.е.).

У цей період відбувається використання методів та способів, які ми зараз відносимо до біотехнологічних:

- виготовлення хлібу;
- виготовлення пива (виготовляли шумери – перші жителі Месопотамії сучасної території Іраку. Набутий досвід передавався та розповсюджувався серед ассірійців, вавилонян, єгиптян та індійців);
- виготовлення оцту;
- отримання медових алкогольних напоїв;
- перша дистиляція у виноробстві;
- виготовлення горілки з хлібних злаків;
- виготовлення шампанського;
- отримання кисломолочних продуктів;
- отримання квашених овочів та капусти;
- силосування кормів.

**Другий період – етіологічний** (від грец. «*aitia*» – причина). Він тривав в період 1856-1933 рр.

Серед досягнень другого періоду слід виділити:

- **1856 р.** – Г. Мендель відкрив закони домінування ознак та ввів поняття одиниці спадковості у вигляді дискретних факторів, які передаються від батьків нащадкам, пізніше названих генами.
- **1859 р.** – роботи Луї Пастера:
  - встановлення мікробної природи бродіння;

- доказ можливості життя у безкисневих умовах;
- виготовлення рідкого поживного середовища.
- **1869 р.** – швейцарський біохімік *Йоганн Фрідріх Мішер* виділив «нуклеїн» (ДНК) з лейкоцитів.
- **1881 р.** – роботи Р. Коха:
  - метод культивування бактерій на стерильних шматочках картоплі та на агаризованих середовищах внаслідок чого стало можливим отримання чистих культур з наступним цільовим використанням (бродиння, окислення).
- **1883 р.** – І. Мечников розробив теорію клітинного імунітету.
- **1892 р.** – Д. Івановський відкрив віруси.

На цей період припадає зародження капіталізму, тому швидко і активно розвивається виробництво пресованих дріжджів, ацетону, бутанолу, лимонної та молочної кислот. У Франції працюють над виготовленням біоустаткування для мікробіологічного очищення стічних вод.

### **Третій період – біотехнічний 1933-1972 рр.**

Усі прогресивні досягнення того часу нашли своє застосування у біотехнології.

- **1933 р.** – *А. Ключвер та А. Перкін* запропонували основні технічні прийоми глибокого культивування пліснявих грибів та методи оцінки продуктів культивування (опублікували роботу «Методи вивчення обміну речовин у пліснявих грибів»). Розпочалося впровадження у біотехнологію великомасштабного герметичного обладнання, яке забезпечує стерильні умови культивування.
- **1936 р.** – сконструйовано та впроваджено у практику біореактор (ферментер, апарат-культиватор).
- **1939-1945 рр.** – розвиток промислового обладнання для виробництва антибіотиків.
- **1943 р.** – виготовлення пеніциліну у промислових масштабах.
- **1939 р.** – *А. Тізеліус* – розробив теорію електрофорезу.
- **1942 р.** – *М. Дельбрюк і Т. Андерсон* вперше побачили віруси у електронному мікроскопі.

- **1948 р.** – народження теля від штучно заплідненої корови.
- **1949 р.** – Дж. Ледерберг відкрив процес кон'югації у *E. coli*.
- **1950 р.** – Ж. Моно розробив теоретичні основи безперервного керованого культивування мікробів.
- **1950 р.** – відкриття Чаргафтом нуклеотидного складу ДНК.
- **1951 р.** – У. Хейс описав плазмиду як позахромосомний фактор спадковості.
- **1953 р.** – американський біолог *Джеймс Уотсон* та британський молекулярний біолог *Френсіс Крік* визначили структуру подвійної спіралі ДНК, що, у свою чергу, призвело до нових відкриттів принципів роботи ДНК на молекулярному рівні.
- **1959 р.** – японські вчені відкрили плазмиди антибіотикостійкості (R-фактор) у дизентерійної бактерії.
- **1960 р.** – С. Очоа і А. Корнберг виділили білки-ферменти які можуть «зшивати» нуклеотиди у полімерні ланцюги. Була виділена ДНК-полімераза з кишкової палички.
- **1961 р.** – М. Ніренберг прочитав перші три букви генетичного коду для амінокислоти фенілаланін.
- **1962 р.** – Х. Корана синтезував хімічним способом функціональний ген.
- **1969 р.** – М. Беквіт і С. Шакіро виділили ген *lac*-оперона у *E.coli*.
- **1970 р.** – Виділили фермент рестриктазу.

Проте, ці відкриття були досягненнями лише у генетиці, мікробіології та біохімії і тільки у **1972 році** науковці запропонували новаторський підхід об'єднання біохімії з технологіями. У цьому році американці *Герберт Бойер, Пол Берг і Стенлі Коен* розробили **рекомбінантну ДНК**, яка поєднала ДНК людини та бактерії. Вчені винайшли спосіб перетворення бактерій у «фабрики» з виготовлення таких важливих для людини білків як інсулін та гормон росту.

Розпочався **четвертий період – генотехнічний** (від грец. «genesis» – походження).

Цей період характеризується створенням нових методів дослідження:

- **1975 р.** – Г. Келер і Ц. Мільштейн описали **метод отримання моноклональних антитіл** (опублікували у журналі «Nature» статтю «Три-

валопереживаючі культури гібридних клітин, які секретують антитіла певної специфічності»).

- **1977 р.** – *М. Максам і У. Гілберт* розробили метод аналізу первинної структури ДНК шляхом хімічної деградації, а *Дж. Сенгер* – шляхом полімеразного копіювання з використанням термінуючих аналогів нуклеотидів.
- **1981 р.** – дозволений до використання у США перший діагностичний набір моноклональних антитіл.
- **1982 р.** – надійшов у продаж *людський інсулін*, отриманий від клітин *E.coli*, дозволено застосування рекомбінантних вакцин; розроблені генно-інженерні *інтерферони, фактор некротизації пухлин, інтерлейкін-2, соматотропний гормон людини*.
- **1986 р.** – К. Мюлліс розробив метод полімеразноланцюгової реакції.
- **1988 р.** – розпочато широкомасштабне виробництво обладнання та діагностичних наборів для ПЛР.
- **1997 р.** – отримання *клону* тварини (вівця Доллі) з диференційованої соматичної клітини.

#### **Досягнення біотехнології у четвертому періоді:**

- Розробка інтенсивних процесів (замість екстенсивних) з продуцентами антибіотиків, ферментів, амінокислот та вітамінів.
- Отримання суперпродуцентів.
- Створення різних продуктів на основі генно-інженерних технологій.
- Створення організмів, які раніше не існували у природі.
- Розробка та впровадження у практику спеціальної апаратури біотехнологічних систем.
- Автоматизація та комп'ютеризація біотехнологічних виробничих процесів при максимальному використанні сировини та мінімальному використанні енергії.

### 3. ОСНОВНІ НАПРЯМИ БІОТЕХНОЛОГІЇ. БІОТЕХНОЛОГІЯ НОВИХ МАТЕРІАЛІВ

Умовно можна виділити наступні основні напрями біотехнології:

- *біоенергетика* – отримання енергії шляхом біотехнологічних процесів;
- *біогеотехнологія* – використання геохімічної діяльності мікроорганізмів в гірничодобувній промисловості;
- *біоелектроніка* – використання біологічних структур в області електроніки;
- *біотехнологія харчових продуктів* (створення нових харчових продуктів із заданими властивостями, харчових добавок тощо);
- *захисту навколишнього середовища від забруднення* (очищення промислових стоків, створення нових матеріалів);
- *препаратів для сільського господарства* (створення бактеріальних добрив, мікробних препаратів інсектицидів, кормових добавок тощо);
- *препаратів і продуктів для промислового і побутового використання;*
- *лікарських препаратів (антибіотиків);*
- *засобів діагностики і реактивів.*

### 4. ОБ'ЄКТИ БІОТЕХНОЛОГІЇ І ЇХ БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ФУНКЦІЇ

**Об'єкти** біотехнології дуже різноманітні й діапазон їх розповсюджується від організованих частин (вірусів) до людини.

Біооб'єкти характеризуються такими показниками, як рівень структурної організації, здатність до розмноження (або репродукції), наявність або відсутність власного метаболізму при культивуванні у належних умовах.

Що стосується **характеру** біооб'єктів, то під цим слід розуміти їх структурну організацію. В такому випадку біооб'єкти можуть бути молекулами (ферменти, імуномодулятори, нуклеозиди, оліго- і поліпептиди тощо), організованими частинами (віруси, фаги), одноклітинними (бактерії, дріжджі) і багатоклітинними особинами (нитчасті вищі гриби, рос-

линні тканини, одношарові культури клітин ссавців), цілими організмами рослин і тварин.

*Біотехнологічні об'єкти знаходяться на різних ступенях організації:*

- субклітинні структури (віруси, плазмід, ДНК мітохондрій і хлоропластів, ядерна ДНК, ферменти);
- бактерії і ціанобактерії;
- гриби;
- водорості;
- найпростіші;
- культури клітин рослин, тварин та людини;
- рослини – нижчі (анабена-азолла) і вищі – ряскові;
- генетично модифіковані організми.

Більшість об'єктів біотехнології становлять мікроорганізми.

***Перспективні біологічні об'єкти:***

- Трансгенні організми, отримані методами генетичної інженерії (*біологічний об'єкт створюється шляхом змін його генетичної інформації з метою виключити небажані та посилити необхідні якості або надати нові*).
- Культури клітин тварин і рослин (*КК є продуцентами інтерферону, вірусних вакцин, моноклональних антитіл, поверхневих антигенів, ангіогенних факторів – фактори, що стимулюють утворення кровоносних судин*).
- Термофільні мікроорганізми та ферменти (*термофільні мікроорганізми продукують ферменти, які характеризуються термостабільністю та високою стійкістю до денатурації у порівнянні з мезофільними. До переваг використання термофільних мікроорганізмів та ферментів слід віднести:*
  - Збільшення швидкості реакції.
  - Підвищення розчинності реактивів.
  - Зменшення мікробного забруднення).
- Анаеробні мікроорганізми (*при анаеробному культивуванні не потрібна аерація середовища і біохімічні процеси повільні, що спрощує систему те-*



пловідведення і підвищує теплотозбереження. Анаеробні мікроорганізми успішно використовуються для переробки відходів та стоків у біогаз).

- Асоціації для перетворення складних субстратів (основні переваги змішаних культур перед монокультурами:
  - Здатність утилізувати складні, неоднорідні за складом субстрати.
  - Підвищена здатність до біотрансформації органічних речовин.
  - Підвищена стійкість до токсичних речовин.
  - Підвищена стійкість до впливу навколишнього середовища.
  - Підвищена продуктивність.
  - Можливий обмін генетичною інформацією між окремими видами угруповання).
- Імобілізовані біологічні об'єкти (імобілізований біологічний об'єкт – це гармонійна система, яка залежить від правильно підібраних об'єкту, носія та способу зв'язування об'єкта з носієм).

## 5. ОСНОВНІ СКЛАДОВІ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Основними компонентами біотехнологічного процесу є біологічний агент, субстрат, сукупність пристроїв для управління процесом і цільовий продукт.

**Перша складова** біотехнологічного процесу – біологічний агент або його компоненти, що виконують основну специфічну функцію, **друга** – субстрат, **третья** – біореактор (ферментер), який за допомогою засобів керування забезпечує кращі умови для функціонування біологічного агента або його компонентів. **Четверта** частина пов'язана з очищенням та поділом необхідного продукту або продуктів, отриманих в ході біотехнологічного процесу.

У більшості технологій, що використовуються в даний час, найбільш стабільною, ефективною і зручною формою **біологічного агента** є цілий мікроорганізм, тому так багато біотехнологій використовують мікробіологічні процеси.

На їх основі створена і розвивається мікробіологічна промисловість, основним завданням якої є виробництво необхідних речовин, амінокислот (лізину, треоніну, триптофану, глютаміну та ін), вітамінів, ферментів,

антибіотиків, біопестицидів для потреб сільського господарства, а також багатьох інших препаратів, що застосовуються в різних галузях народного господарства.

Мікроорганізми у біотехнологічному процесі можуть зберігати дуже високу швидкість росту, завдяки цьому величезні кількості їх можуть бути отримані при сприятливих умовах в короткий проміжок часу. Для різних процесів проводять селекцію потрібних форм мікроорганізмів з наявних в природі, модифікацію мікроорганізмів за допомогою мутацій або зміною їх за допомогою генетичної інженерії. У багатьох технологіях використовується не цілий мікроорганізм, а виділені з нього і очищені ферменти.

**Субстрати**, що використовуються в біотехнології і одержані продукти дуже різноманітні. Нерідко продукт одного біотехнологічного процесу стає субстратом іншого. Прикладом може служити одержання етанолу, який є субстратом в інших біотехнологічних процесах.

Третя складова частина біотехнологічного процесу включає всі аспекти підтримуючої системи, наприклад **біореактор**, всередині якого для біологічного агента або його складових частин створюються оптимальні умови. Тут втілені знання біологів і інженерів, що забезпечують дизайн і приладове оформлення, необхідне для створення і контролю фізико-хімічних параметрів, таких як температура, аерація, рН і т.д.

Досягнувши по закінченні біотехнологічного процесу бажаного результату, наприклад накопичення в реакторі біомаси або іншого цільового продукту, в більшості випадків необхідно потрібний продукт відокремити від компонентів, що містяться у водній фазі. Цей четвертий етап біотехнологічного процесу, названий **процесом виділення і очищення цільового продукту**, спочатку зводиться до поділу вмісту біореактора на рідку і тверду фази з подальшою концентрацією і очищенням потрібного продукту.

### **КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ:**

1. Що таке біотехнологія?
2. У чому полягає взаємозв'язок біотехнології з іншими науками?
3. Які основні етапи становлення біотехнології?
4. Які основні напрямки розвитку біотехнології?
5. Перерахуйте основні стадії біотехнологічного виробництва.
6. Які об'єкти біотехнології ви знаєте?

# КУЛЬТУРИ ТВАРИННИХ КЛІТИН І ТКАНИН

## ПЛАН

1. Культивування клітин. Історія розвитку методу.
2. Використання клітинних культур.
3. Використання культури клітин людини.
4. Основні принципи культивування.
5. Умови культивування клітин та поживні середовища.
6. Гібридизація тваринних клітин.

## 1. КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН. ІСТОРІЯ РОЗВИТКУ МЕТОДУ

**Культивування клітин – це один з найперспективніших методів у біотехнології.**

**Культивування клітин** – процес, за допомогою якого *in vitro* (поза організмом, дослівно – «на склі») єдина або окремі клітини прокариот чи еукаріот штучно вирощуються в контрольованих умовах.

На практиці термін «культура клітин» відноситься в основному до вирощування клітин, що відносяться до однієї тканини, отриманих від багатоклітинних еукаріот, найчастіше тварин.

**Історія розвитку методу культивування клітин тварин.**

**Для того щоб вирощувати і розмножувати клітини в культурі (*in vitro*) необхідно було вирішити ряд практичних завдань:**

1. Розробити методику отримання клітин з тканин, що не містять екзогенних (чужорідних, супутніх) клітин бактерій і грибів.
2. Розробити живильні середовища, в яких виділені з організму клітини могли б продовжувати рости і розмножуватися, тобто в середовищах повинні міститися всі необхідні для клітини живильні речовини і підтримуватися необхідні фізико-хімічні умови.

3. Розробити методики спостереження за клітинами і контролю їх динаміки розвитку.
4. Розробити методики тривалого культивування клітин в асептичних умовах.

Важливу роль у формуванні теоретичних основ культивування клітин мало і **формування концепції гомеостазу Клода Бернара (1813-1878)**. Суть її зводиться до того, що живі організми здатні зберігати своє внутрішнє середовище постійним, незважаючи на зміни в навколишньому середовищі. Ця концепція поширюється і на рівень клітини: клітина як функціональна одиниця організму здатна підтримувати свій внутрішньоклітинний стан та в певних умовах підтримувати свою життєдіяльність.

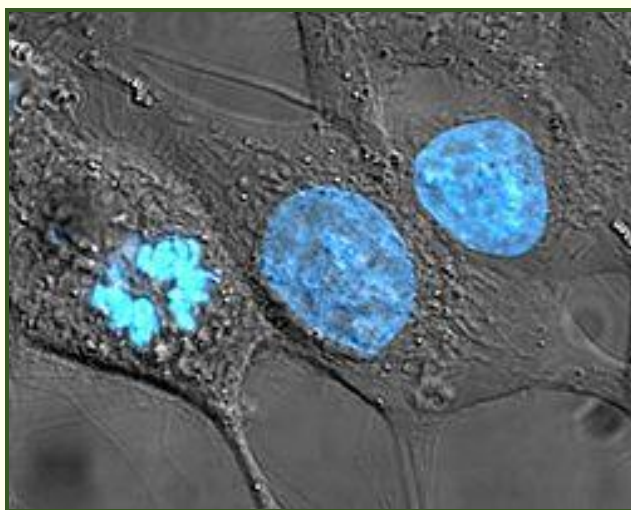
***Для розвитку методу культивування клітин мали значення ряд подій:***

- У XIX столітті англійський фізіолог **С. Рінгер** розробив сольовий розчин, що містить хлориди натрію, калію, кальцію і магнію для підтримки биття серця тварин поза організмом (сьогодні розчин Рінгера (розчин Рінгера-Локка, Рінгера-Тіроде, Кребса-Рінгера.) – це фізіологічний розчин, який за своїм складом близький до плазми крові).
- У 1885 році **Вільгельм Ру** встановив принцип культивування тканин – витягував частину кісткового мозку з курячого ембріона і тримав його в теплому фізіологічному розчині протягом декількох днів.
- Дещо пізніше **Лоеб** (1897 р.) показав, що клітини крові і сполучної тканини можуть виживати в пробірках з сироваткою і плазмою крові, а **Льонгрем** (1898 р.) – підтримувати експлантати шкіри людини в життєздатному стані, і вони зберігали здатність до реімплантації.
- У 1910 р. **Пейтон Раус**, працюючи з культурою клітин саркоми курчати, індукував утворення пухлин у здорових тварин. Пізніше це привело до відкриття онкогенних вірусів (Нобелівська премія по фізіології або медицині 1966 р.).
- Значним етапом у розвитку методів культивування клітин є роботи **Алексіса Карреля**. Будучи хорошим хірургом, Каррель володів методами асептики, що і дозволило йому домогтися значних результатів з культивування клітин *in vitro*. Культивування клітин серця курки

ним було розпочато 17 січня 1912 р. і тривало 34 роки (за іншими даними триває до цих пір). Процедура культивування в лабораторії А. Карреля була дуже складною, і її не змогли відновити в інших лабораторіях. Для культивування клітин використовувалося модифіковане середовище Рінгера.

Методи культивування клітин отримали значний розвиток в 1940-1950-х роках у зв'язку з дослідженнями в області вірусології. Вирощування вірусів в культурах клітин дало можливість отримання чистого вірусного матеріалу для виробництва вакцин. **Вакцина проти поліомієліту** стала одним з перших препаратів масово введених з використанням технології культивування клітин. У 1954 р. **Ендерс, Уеллер і Роббінс** отримали Нобелівську премію «За відкриття здатності вірусу поліомієліту рости в культурах різних тканин».

У 1951 р. була отримана широко відома лінія ракових клітин людини **HeLa** (HeLa – лінія «безсмертних» ракових клітин, отримана з ракової пухлини шийки матки пацієнтки на ім'я Генрієтта Лакс (англ. **Henrietta Lacks**). Лінія клітин HeLa використовується для дослідження ракових захворювань (рис. 2).



*Рис. 2. HeLa – лінія «безсмертних» ракових клітин*

В даний час ведуться інтенсивні дослідження біології клітин в культурі і, ймовірно, будуть відкриті нові особливості поведінки клітин в культурі.

## 2. ВИКОРИСТАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

Незважаючи на те, що основним об'єктом біотехнології є мікроорганізми, які характеризуються цілим рядом переваг, їх клітини не завжди можуть бути використані в тих чи інших процесах.

Цілий ряд білкових продуктів доцільно отримувати в культурі клітин тварин.

Біомаса культур клітин багата різними біологічно активними речовинами, і вона може бути використана для отримання цільового продукту:

### ***1. Отримання вірусних вакцин.***

Перша вакцина, виготовлена на основі культур клітин, була отримана в **1954 р. проти поліомієліту** американським ученим **Солком**.

В даний час в культурі клітин отримують різні вакцини для людей (проти поліомієліту, кору, паротиту, сказу, краснухи, грипу та ін.) і для сільськогосподарських тварин, та ведуться інтенсивні розробки нових вакцин на основі використання технології рекомбінантних ДНК.

### ***2. Отримання інсектицидів в культурі клітин.***

Інсектициди можна отримати з вірусів, які летальні для комах певного виду і мають перевагу в тому, що не забруднюють навколишнє середовище в порівнянні з хімічними речовинами.

### ***3. Отримання інтерферонів в культурі клітин тварин.***

Інтерферон – це білок, що синтезується лейкоцитами у відповідь на вплив специфічних чужорідних речовин. Він був відкритий в 1957 р. в клітинах курчати, які були заражені вірусом грипу. Однак подальші дослідження інтерферонів показали, що вони можуть синтезуватися не тільки лейкоцитами, але й іншими клітинами ссавців, а у відповідь на вірусну інфекцію синтезується не один, а ціле сімейство інтерферонів. Інтерферони інгібують розмноження вірусів у клітині.

Інтерферони – видоспецифічні білки, тобто для кожного виду тварини характерний свій інтерферон. Однак вони не вірусоспецифічні, тобто пригнічують розмноження різних вірусів у клітині.

Інтерферони отримують з лейкоцитів крові людини, фібробластів. Лейкоцити виділяють і переносять у культуральне середовище та інфі-



кують їх вірусом (Сендай, або вірус Нью-Каслської хвороби), інкубують протягом ночі, після цього лейкоцити осаджують центрифугуванням, вірус інактивують. У супернатанті міститься нативний інтерферон. Його висушують і запаюють в скляні ампули.

#### ***4. Інші області застосування культур клітин тварин.***

Ще однією областю використання клітин тварин є використання клітин при випробуванні різних сполук на токсичність, скринінг біологічно активних речовин, дослідження механізмів дії ксенобіотиків тощо.

### **3. ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ**

Практично будь-які клітини людини можуть бути введені в культуру і служити засобом і об'єктом в багатьох медико-біологічних дослідженнях.

Одна з найважливіших переваг клітин в культурі – можливість прижиттєвого спостереження за ними за допомогою мікроскопу.

Використання культури клітин людини дає змогу:

- рівноцінно замінити клінічні експерименти (експерименти, що вимагають з'ясування того або іншого питання з використанням 1000 чоловік, можуть бути з рівною статистичною достовірністю поставлені на 100 культурах на покривних склах).
- розширити дослідження і діагностику різних захворювань, оскільки є можливість оцінки не тільки морфологічних і біохімічних змін, але і змін в поведінці клітин, їх реакції на різні агенти, у тому числі і на лікарські дії.
- тестувати і вивчити механізм дії різних речовин, які можуть бути використані як лікарські препарати, детергенти, косметичні засоби, інсектициди, консерванти.

Слід зауважити, що результати, отримані на клітинних культурах, не можна екстраполювати на цілий організм, але якщо речовина, що вивчається, надає пошкоджуючу дію в декількох лініях культивованих клітин, то слід чекати несприятливого ефекту і на організм людини.



## 4. ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ КУЛЬТИВУВАННЯ

Відповідно до цілей і завдань експериментальної роботи можна виділити два напрями культивування тваринних клітин:

- культури клітин;
- культури органів і тканин (органні культури).

**Список типів клітин, які вже введені в культуру, достатньо великий:**

- елементи сполучної тканини людини (фібробласти);
- скелетні тканини (кістка і хрящі);
- скелетні, серцеві і гладкі м'язи;
- епітеліальні тканини (печінка, легені, нирки і ін.);
- клітини нервової системи;
- ендокринні клітини (надниркові, гіпофіз, клітини острівців Лангерганса);
- меланоцити і різні пухлинні клітини.

Для введення в культуру, залежно від завдань, обирають тканину – дорослу або ембріональну, нормальну чи пухлинну.

Культури, отримані з *ембріональних* тканин, характеризуються кращим виживанням і активнішим ростом, в порівнянні з відповідними *зрілими* тканинами, оскільки вони містять більше спеціалізованих клітин, що не діляться.

*Нормальні* тканини дають початок культурам з обмеженим часом життя, тоді як культури, отримані з *пухлин*, здатні проліферувати необмежено довгий час.

Культури клітин, узяті безпосередньо від об'єкту називаються *первинними*. Більшість первинних клітин, за винятком пухлинних, мають обмежений термін використання. Після певної кількості ділень такі клітини старіють і припиняють ділитися.

Існують *іморталізовані* («безсмертні») *лінії клітин*, здатні розмножуватися нескінченно. Така властивість характерна в основному пухлинним клітинам.

### ***Біотехнологія культур клітин базується на:***

1. Здатності виділених з організму клітин рости і розмножуватися поза організмом (*in vitro*).
2. Можливості змінювати функціональні властивості клітин в культурі завдяки зміні умов культивування або їх часткової генетичної модифікації.

Однак розробка клітинних технологій, спрямованих на отримання цінних продуктів – метаболітів клітин, стикається з низкою труднощів, обумовлених особливостями поведінки клітин в культурі:

- в культурі дуже важко зберегти спеціалізовані властивості клітин, так як після переведення їх в нові умови вони швидко адаптуються і можуть змінювати свої властивості;
- в культурі клітини схильні до *дегенерації* (переродження) та *трансформації* (зміна ростових властивостей);
- здатні до швидкого *старіння*, що не вигідно для біотехнологічних процесів.

Ріст клітин в культурі регулюється різними факторами. Контроль регуляції проліферації може бути представлений як серія послідовних подій, що включають:

1. Вплив різних позаклітинних агентів на рецептори клітинної мембрани.
2. Перенесення інформації від поверхні мембрани за допомогою різних цитоплазматичних переносників.
3. Дія сигнальних молекул на клітинне ядро і ініціацію реплікації.

Найімовірніше регуляція проліферації є результатом інтеграції багатьох чинників, що впливають на клітину. Однак закономірності інтеграції цих факторів залишаються малодослідженими.

## 5. УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН ТА ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА

Клітини у культурі можна вирощувати:

- у вигляді моношару (адгезивному стані);
- у суспензії.

### *Культивування клітин у вигляді моношару.*

**Моношар** – це культивування клітин на поверхні культурального посуду і у вигляді шару клітин.

Ця система культивування фізично і біохімічно найбільш схожа з живими тканинами і має ряд переваг:

- дозволяє легко змінювати культуральне середовище, так як клітини прикріплені до поверхні;
- отримувати високий рівень експресії клітинних продуктів, так як у клітин прикріплених до субстрату ефективніше експресуються клітинні продукти;
- забезпечити максимальну гнучкість досліджень, оскільки може використовуватися для будь-якого типу клітин.

Поряд з цим, моношарова культура має і недоліки:

- виникають труднощі при збільшенні масштабу культивування;
- вимагає великих просторів;
- важко визначати динаміку росту клітин;
- важко забезпечувати гомогенність клітин.

Клітини моношару прикріплюються до поверхні за рахунок електростатичних взаємодій, тому поверхня культуральних посудин повинна бути змочуваною і негативно зарядженою.

Цього можна досягти хімічною обробкою окислюючими агентами або фізичними діями (високовольтним розрядом, ультрафіолетовим світлом, бомбардуванням високоенергетичними електронами). Фірми, що виробляють пластиковий посуд, використовують ці методи.

В якості субстрату в даний час використовують декілька матеріалів:

- зі скла краще за все – **пірекс** (алюмоборосилікатне скло);
- із пластика – полістирол, полікарбонат, полівінілхлорид, тефлон та ін.;
- з металу – **неіржавіюча сталь і титан.**

### ***Культивування клітин у суспензії.***

Суспензійна культура – це вирощування окремих клітин або невеликих їх груп у завислому стані у рідкому живильному середовищі з використанням апаратури, що забезпечує їх аерацію і перемішування. Характерною особливістю суспензійних культур є їх морфологічна та біохімічна гетерогенність. Клітинна популяція містить клітини, які відрізняються за розміром і формою.

### **Існує 2 основних системи культивування клітин:**

**1. Непроточні культури** – тип культур, в якому клітини вводять у фіксований об'єм середовища. У міру росту клітин відбувається використання живильних речовин і накопичення метаболітів, тому середовище повинно періодично змінюватися, що призводить до зміни клітинного метаболізму. З часом, в результаті виснаження середовища відбувається припинення проліферації клітин.

Збільшити тривалість життя непроточних культур можна декількома способами:

- переривчастим (частина культури замінюється рівним об'ємом свіжого середовища);
- постійним (об'єм культури збільшується з постійною низькою швидкістю, а невеликі порції клітин періодично видаляються);
- перфузійним (здійснюється постійне надходження свіжого середовища в культуру і одночасне видалення рівного об'єму використаного (безклітинного) середовища).

Всі системи непроточних культур характеризуються накопиченням відходів в тій або іншій формі і непостійністю зовнішніх умов.

**2. Проточні культури** забезпечують гомеостатичні умови без зміни концентрації живильних речовин і метаболітів, а також кількості клітин.

Гомеостаз обумовлений постійним надхоженням середовища в культуру і одночасним видаленням рівного об'єму середовища з клітинами.

Для підтримки нормального функціонування культур клітин періодично проводять **заміну** живильного середовища, **пасажирування** (відбір невеликої кількості клітин для вирощування в іншій лабораторній посудині) і **трансфекцію** (введення невірусним методом чужорідної ДНК для керованої експресії генів) **чи трандукцію** (введення чужорідної ДНК за допомогою вірусів) клітин.

Для культивування клітин необхідні умови, що підтримують їх структуру та функціональну активність. Це забезпечують **поживні середовища**.

Поживне середовище повинне максимально відтворити склад природного оточення клітини, тобто систему *in vivo*. На сьогодні повний склад природних середовищ клітин ще до кінця не розшифрований і він досить динамічний, а, отже, їх склад не може бути стандартизований.

**Поживні середовища для вирощування клітин повинні задовольняти двом основним вимогам:**

- 1) підтримувати фізико-хімічні умови існування клітин: осмолярність, концентрації іонів водню, необхідний іонний склад і буферну ємність;
- 2) забезпечувати клітини поживними речовинами, необхідними для синтезу органічних речовин (біомаси та продуктів життєдіяльності).

Залежно від міри задоволення цим вимогам поживні середовища можуть бути розділені на **збалансовані сольові середовища** і **ростові середовища**.

Практично всі **збалансовані сольові розчини** є похідними фізіологічного розчину, який був розроблений Рінгером в 1895 р. До складу розчину Рінгера входять три катіона – кальцій, натрій і калій в таких пропорціях, в яких вони знаходяться в морській воді або крові вищих тварин. Першим збалансованим сольовим розчином, призначеним для клітин ссавців, був розчин **Тіролі**. В даний час найбільш широко використовуються середовища **Ерла** [Earle W., 1934], **Хенкса** [Hanks I., 1948] і **Дульбекко та Фогта** [Dulbecco R., Fogt M., 1964].

**Ростові середовища** забезпечуються клітини поживними речовинами, необхідними для їх росту.

Повна оптимізація складу поживних середовищ досить складне завдання і повинно вирішуватися окремо для конкретного типу клітин. Це пов'язано з тим, що потреба в компонентах живлення для різних типів клітин різна.

Середовища також класифікують як **сироваткові і безсироваткові**.

**Сироваткові середовища** – на основі сироватки крові – забезпечують ріст клітин ссавців в системі *in vitro*. Найоптимальнішим є застосування телячої ембріональної сироватки, оскільки вона характеризується високими ростовими параметрами.

Сьогодні встановлено цілий ряд її функцій в рості клітин:

- Зв'язує і нейтралізує токсини.
- Інактивує протеази середовища.
- Постачає гормони і пептидні фактори росту.
- Забезпечує клітину поживними речовинами.
- Створює буферну ємність.
- Сприяє прикріпленню клітин до субстрату.
- Захищає клітинні культури.
- Є джерелом транспортних білків, які переносять низькомолекулярні речовини.

Використання сироватки в поживних середовищах створює і цілий ряд серйозних проблем: не завжди відомий її склад, велика вартість, є джерелом контамінації (інфікування вірусами, бактеріями, грибами), неможливість контролю складу середовища.

#### **Безсироваткові середовища.**

Використання безсироваткових середовищ дозволяє:

- покращити відтворюваність експериментальних результатів і забезпечити стабільну продуктивність культур;
- значно знизити ймовірність зараження культури вірусами або мікоплазмами;
- забезпечити відносно просту систему очистки продуктів метаболізму клітин.

Поряд з цими важливими перевагами, безсироваткові середовища мають і недоліки:

- необхідне додавання в ці середовища гормонів і факторів росту, що робить їх такими ж вартісними, як і середовища з сироватками.
- можуть використовуватися лише для окремих типів клітин, тобто не є універсальними.

## 6. ГІБРИДИЗАЦІЯ ТВАРИННИХ КЛІТИН

Припущення про те, що соматичні клітини можуть зливатися один з одним, було висловлене ще в початку XIX століття у зв'язку з відкриття багатоядерних клітин.

Нормальні клітини в природних умовах у край рідко зливаються один з одним. Виняток становить процес запліднення. Крім того, як подібний рід виключення виступає процес плазмогамії у вищих грибів, коли одноядерні гаплоїдні клітини зливаються, утворюючи двоядерні (дикаріони). У ссавців, наприклад, клітини можуть зливатися при формуванні м'язових трубочок. Звичайним явищем є злиття пухлинних клітин *in vivo*. При цьому пухлинні клітини іноді зливаються і з нормальними.

Гібридизація широко використовується в генетиці, біології клітини, біології розвитку, вірусології, біології пухлин та інших галузях біологічної науки, а також на практиці.

Гібриди соматичних клітин були відкриті лише в 60-х роках XX століття. У 1960 р. Панський із співробітниками повідомили про виділення лінії гібридних клітин. Гібридні клітини були отримані шляхом змішування двох ліній, виділених раніше з 1 клітини мишачої саркоми. Пізніше було встановлено, що клітинні гібриди можна отримати, використовуючи клітини різних видів тварин. Як агент, що індукує злиття виступав інактивованій вірус NVJ, званий також вірусом Сендай. З цих пір вірус Сендай почав широко використовуватися в експериментах зі злиття клітин.

### **Розрізняють наступні гібридні клітини:**

- **Типові гібридні клітини:**

**Гетерокаріон** – це гібридна клітина, яка містить у своїй цитоплазмі два або декілька різних чи однакових ядер. Гетерокаріони не діляться.



**Синкаріон** – це гібридна клітина, в якій відбулося об'єднання хромосом різних клітин в одне ядро.

- **Особливі типи гібридних клітин:**

**Гібридна клітина**, що включає в себе каріопласт (ядро, оточене тонким шаром цитоплазми) + цитопласт (безядерна цитоплазма);

**Гібридна клітина**, що включає в себе цілу клітину + цитопласт;

**Каріобрид** – гібридна клітина, що включає в себе цілу клітину + каріопласт.

### **6.1. Механізм злиття клітин при утворенні гібридних клітин**

Для індукції злиття клітин використовуються речовини різної природи.

Це іони  $Ca^{2+}$ , поліетиленгліколь, лізолецитин, моноолеат гліцерину, вірус Сендай:

- **Лізолецитин** – поверхнево-активна речовина ліпідної природи, продукт деградації лецитину шляхом обробки останнього фосфоліпазою. Лізолецитин ушкоджує мембрани і токсичний для живих систем. Цитотоксичний ефект цієї речовини можна зменшити, знижуючи його концентрацію або, додаючи під час обробки альбумін.
- **Моноолеат гліцерину** також сполука ліпідної природи, але його пошкоджуюча дія менш виражена, а частота злиття клітин при застосуванні цієї речовини зростає в 4-7 разів, у порівнянні із спонтанним процесом.
- **Вірус Сендай** – характеризується повною відсутністю цитотоксичного ефекту. Перед використанням його інактивують, опромінюючи ультрафіолетовою лампою протягом 5 хвилин, при цьому він втрачає здатність до розмноження, але зберігає здатність зливати клітини. Одна цей метод сьогодні майже не використовується.
- Використання **поліетиленгліколю (ПЕГ)** – стандартний спосіб, який застосовується при злитті клітин тварин та рослин між собою та один з одним.
- Злиття клітин з використанням лазерного та нейтронного опромінення.

- *Електрозлиття* – клітини попередньо зближені між собою, піддають впливу електричного поля; спочатку проходить об'єднання мембран, потім цитоплазми і нарешті гібридної клітини.

## **6.2. Гібридома. Моноклональні антитіла**

Злиття соматичних клітин лежить і в основі отримання **гібридних клітин, що продукують антитіла**.

Антитіла – білки сироватки крові, які синтезуються в організмі як прояв захисної реакції при попаданні в нього чужорідної речовини (антигена).

Імунна система виробляє специфічні антитіла на величезну кількість антигенів (клітини мікроорганізмів, віруси, білки, нуклеїнові кислоти тощо). Отримання антитіл для потреб людини до певного виду антигену – одна з найбільш складних завдань медицини та біотехнології.

Згідно клонально-селекційної теорії кожен тип антитіл синтезується і секретується в кровотоці окремим клоном В-лімфоцитів, тобто в кожному В-лімфоциті синтезується тільки один тип антитіл. Виходячи з цього випливає, що якщо виділити В-лімфоцит, перевести його в культуру і отримати клон, то отриманий клон клітин буде продукувати однотипні антитіла, які називають моноклональні. Однак проблема в тому, що виділені лімфоцити в культурі не діляться.

Вирішення проблеми було запропоноване в 1975 році англійськими ученими **Георгом Келером і Цезарем Мільштейном**. Їх заслуга полягає в тому, що вони розробили технологію, яка дозволила здійснювати отримання клонів В-лімфоцитів у культурі і продукувати моноклональні антитіла. Авторам вдалося досягти цього, використовуючи метод гібридації соматичних клітин – В-лімфоцитів і клітин мієломи.

Гібридна клітина між спеціалізованою В-клітиною і пухлинною мієломною клітиною, отримала назву **гібридоми**. Гібридома в умовах культури здатна до проліферації і продукції моноклональних антитіл. Цей технологічний напрямок отримав назву **гібридної технології** і сприяв інтенсивному розвитку імунобіотехнології.

*Гібридна технологія здійснюється у кілька етапів або стадій:*

- 1) імунізація тварин;
- 2) виділення В-лімфоцитів з селезінки;
- 3) культивування клітин мієломи;
- 4) злиття В-лімфоцитів і мієломних клітин;
- 5) культивування гібридомних клітин;
- 6) скринінг клонів, які продукують моноклональні антитіла;
- 7) розмноження гібридами *in vitro* (a) чи *in vivo* (b);
- 8) продукування моноклональних антитіл гібридомою.

### **Застосування моноклональних антитіл:**

1. Найширше використовуються моноклональні антитіла в медичній діагностиці. Розроблені системи діагностики, що дозволяють виявити в організмі патологічні зміни, хворі органи тощо (МКА приєднуються до уражених хворобою клітин організму, а відповідні індикаторні матеріали дозволяють з'ясувати їх місцезнаходження). Так, у Англії вдалось отримати антитіла, які специфічно «впізнають» злоякісні пухлини товстої та прямої кишки.
2. За допомогою біосенсорів, сконструйованих на основі моноАТ, діагностують вагітність, виявляють схильність до діабету, ревматоїдного артриту, спадкових захворювань.
3. За допомогою моноАТ, у формі іммунотоксинів (комплексів моноклональних антитіл з отрутами білкової природи, таких як дифтерійний токсин, рицин тощо) можна здійснювати лікування метастазуючих пухлин.
4. МКА використовуються в процесах очищення речовин. Сучасні технології засновані на приєднанні антитіл до твердої матриці носія. До них додають суміш молекул, що містить шуканий антиген. Потім комплекси антиген – антитіло відмиваються від домішок, не пов'язаних з матрицею. Після руйнування ковалентних зв'язків антиген-антитіло в розчині залишаються вільні антигени.
5. Завдяки високій специфічності МКА широко використовуються як зонди для точного визначення природи молекул поверхні клітин і клітинної органели. З їх допомогою також можна проводити детекцію активності ферментів.

6. Методи імуноферментного аналізу застосовують в діагностиці вірусних захворювань рослин. Це дозволяє скоротити час отримання безвірусного посадкового матеріалу, відбирати нові вірусостійкі сорти.
7. За допомогою моноАТ можливе виділення біологічно активних речовин (білків, гормонів, токсинів) зі складних сумішей.
8. МоноАТ здатні також нейтралізувати дію лімфоцитів, що відповідають за відторгнення трансплантату, а також аутоантитіл, які утворюються при аутоімунних захворюваннях (деякі форми діабету, розсіяний склероз, ревматичні хвороби).
9. В поєднаннях з лікарськими препаратами вони можуть значно посилювати ефективність дії останніх на клітини-мішені, дозволяючи при цьому уникати серйозних побічних явищ, які як правило супроводжують хіміотерапію раку.

### **КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ**

1. Основні відкриття вагомими для розвитку методу культури клітин тварин.
2. Назвіть області використання клітинних культур.
3. Які клітини та тканини людини введені в культуру?
4. Які основні принципи культивування?
5. Умови культивування клітин.
6. Що таке проточні та непроточні культури?
7. Вимоги до поживних середовищ.
8. Як класифікують поживні середовища?
9. Що таке гібридизація тваринних клітин?
10. Які є механізми злиття клітин при утворенні гібридних клітин?
11. Що таке гібридома? Де застосовують моноклональні антитіла?

# КУЛЬТУРИ КЛІТИН ВИЩИХ РОСЛИН

## ПЛАН

1. Значення, напрямки та можливості використання культури ізольованих клітин і тканин рослин.
2. Тотипотентність рослинної клітини.
3. Культура калусних тканин.
4. Суспензійні культури.
5. Культура окремих ізольованих клітин, або культура поодиноких клітин.
6. Умови та методи культивування тканин *in vitro*.
7. Протопласти рослинних клітин як об'єкт біологічного конструювання.
8. Мікроклональне розмноження і оздоровлення рослин.
9. Методи збереження генофонду. Методика кріоконсервації, способи уповільнення росту.

## 1. ЗНАЧЕННЯ, НАПРЯМКИ ТА МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУРИ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН І ТКАНИН РОСЛИН

Клітини і тканини вищих рослин, що вирощуються поза організмом на штучних поживних середовищах в строго контрольованих умовах дозволяють вивчати ріст, клітинне диференціювання і розвиток рослинного організму, розробляти нові клітинні технології для промисловості і сільського господарства.

Культури ізольованих клітин і тканин рослин дозволяють вирішувати такі глобальні проблеми, як забезпечення населення продовольством, більш ефективну медицину, оптимальну екологію.

**Культура клітин і тканин рослин може використовуватися в двох основних напрямках:**

- 1) розмноження або підтримання життя у незмінених, у порівнянні з донорами, клітин, тканин, рослин;

2) цілеспрямований вплив на зміну генетичного статусу клітин і відбір в селективних умовах потрібних варіантів.

**Можливості культури ізольованих клітин і тканин рослин величезні:**

- отримання вторинних метаболітів, що продукуються окремими клітинами і тканинами деяких корисних рослин (алкалоїдів, глюкозидів, стероїдів і т.д.), що використовуються для виробництва ліків;
- клітинна і тканинна селекція форм з корисними господарськими властивостями;
- генетичне поліпшення сільськогосподарських рослин;
- прискорене отримання цінних та унікальних генотипів (мікророзмноження) і підтримання життєздатності ослаблених клітин і тканин;
- звільнення (оздоровлення) посадкового матеріалу від вірусної інфекції;
- збереження генофонду в умовах кріоконсервації.

З використанням методів культивування також вирішується велика кількість **теоретичних проблем**, у тому числі:

- особливості старіння рослинної клітини;
- процеси цитодиференціації і морфогенезу;
- роль фітогормонів, вуглеводів, вітамінів, мінеральних речовин при калусогенезі, органогенезі, морфогенезі;
- взаємодія клітин вищих рослин з бульбочковими бактеріями і мікоризними грибами;
- механізми стійкості рослин до несприятливих факторів середовища: абіотичних (засолення, кисле середовище, низькі температури і т.д.) та біотичних (патогенів різного походження, що викликають хвороби рослин);
- регуляція вторинного обміну;
- механізми пухлиноутворення;
- популяційні взаємодії в клітинній культурі.

## 2. ТОТИПОТЕНТНІСТЬ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ

У основі культивування рослинних клітин лежить властивість тотипотентності, завдяки якій соматичні клітини рослини здатні повністю реалізувати спадкову інформацію, тобто забезпечити розвиток всієї рослини.

**Тотипотентність** (лат. *Totus* – весь, *potentia* – сила) – це властивість клітини реалізувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання і розвиток до цілого організму. Тотипотентністю характеризуються запліднені яйцеклітини рослинних і тваринних організмів.

У вищих тварин з ранніх етапів ембріогенезу, з початком спеціалізації клітин, тотипотентність не реалізується. Однак клітини, ізольовані з ембріонів ссавців, в умовах культивування можуть зберігати **плюріпотентність** – здатність диференціюватися в усі типи клітин як власне зародка, так і екстраембріональних тканин. Такі клітини отримали назву **ембріональних стовбурових клітин**.

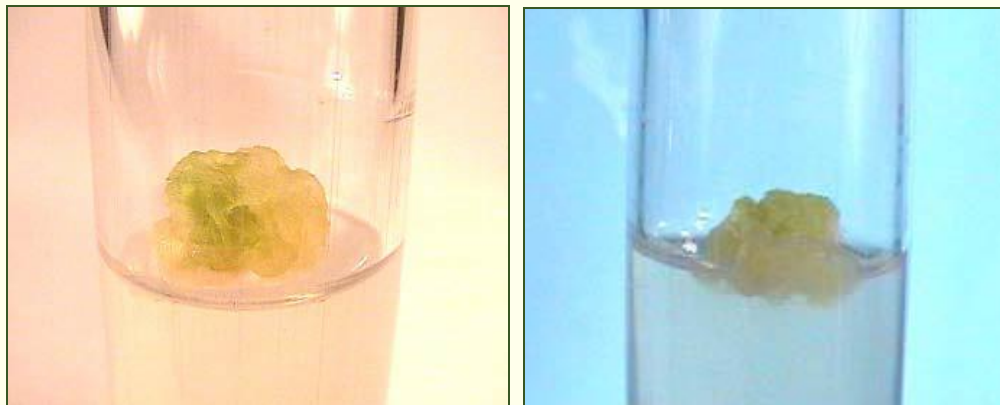
У рослин в природних умовах (*in vivo*) тотипотентність можуть проявляти і спеціалізовані клітини. Приклад тому – вегетативне розмноження, в тому числі те, яке спостерігається в результаті розвитку рослин з клітин листя бегонії, фіалки або каланхое.

Тотипотентність у рослин реалізується і при загоєнні ран. У цьому випадку на поверхні рани рослин в результаті неорганізованої проліферації клітин відбувається розвиток **калусу** (лат. *callus* – товста шкіра, мазоль) (рис. 3). **Калусом** називаються недиференційовані клітини, що мають властивість тотипотентності і здатні давати початок цілій рослині.



### 3. КУЛЬТУРА КАЛУСНИХ ТКАНИН

**Калусна культура** – це неорганізовано проліферуюча тканина, яка виникає з дедиференційованих клітин.



*Рис. 3. Калус, утворений в культурі незрілих зародків ячменю*

Є три фази росту клітин: 1 – поділ, 2 – розтягування, 3 – диференціювання (потовщення вторинної клітинної оболонки і втрата здатності до поділу).

Для того щоб диференційовані клітини знову набули здатність до поділу, необхідно, щоб відбулося їх дедиференціювання, тобто клітини повинні як би повернутися в меристематичних стан.

Розмноження дедиференційованих клітин призводить до анархічного, неорганізованого росту, в результаті чого утворюється калусна тканина. Тобто перетворення спеціалізованої клітини в калусну пов'язано з індукцією клітинного поділу, здатність до якого вона втратила в процесі диференціювання.

Як правило, для індукції калусних тканин необхідна присутність двох гормонів: ауксинів (дедиференціювання і підготовка до поділу) і цитокінінів (проліферація – поділ).

Перехід клітини в пробірці з диференційованого стану до дедиференціювання і активного поділу зумовлений зміною активності генів.

### ***3.1. Особливості калусних клітин***

Калусні клітини мають як спільні, так і відмінні риси з нормальними клітинами.

*Подібні властивості калусних і нормальних клітин:*

- Синтез вторинних метаболітів.
- Морозо- та жаростійкість, стійкість до низьких і високих температур.
- Фотоперіодична реакція (зберігається активність фітохромому).
- Стійкість до осмотично активних речовин, до засолення і т.п.

*Відмінності від нормальних клітин:*

- Зміна складу білків: в калусних клітинах з'являються специфічні білки і одночасно зникають або зменшується кількість білків, характерних для фотосинтезуючих клітин листка.
- Фізіологічна асинхронність, гетерогенність за віком. Присутні молоді клітини в G1-фазі, старі – в G2 і в S-фазах циклу клітинних поділів.
- Більш тривалий клітинний цикл, ніж у рослин, які ростуть у відкритому ґрунті.
- Необмежений, анархічний ріст.
- Слаборозвинуті мітохондрії, як і в меристематичних клітинах (в них мало крист, що впливає на активність аеробного дихання).
- Особливості енергетичного обміну. Споживають менше кисню у порівнянні з нормальними.
- Підвищене споживання вуглеводів (в 19 разів), через аеробний гліколіз (безкисневе розщеплення вуглеводів у присутності кисню).
- Зрушення в обміні вуглеводів в напрямку пентозофосфатного шляху, який є джерелом пентоз, необхідних для діляться клітин.

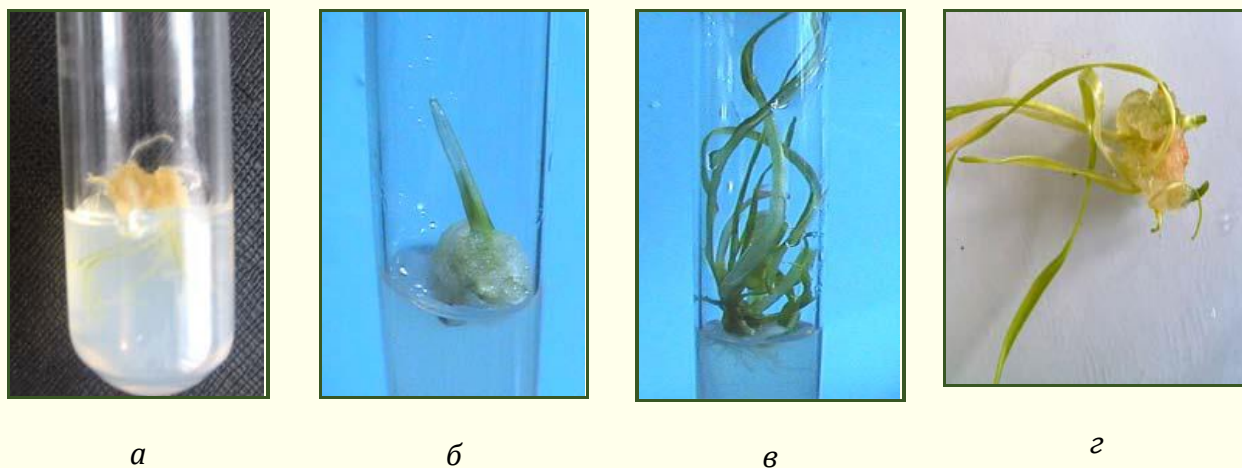
Перераховані особливості калусних клітин дозволяють ефективно використовувати їх в отриманні вторинних метаболітів і селекції рослин.

### 3.2. Морфогенез в калусних тканинах

Існує кілька шляхів, якими може піти калусна клітина після її дедиференціювання:

- 1) вторинна регенерація цілої рослини, можливе диференціювання на рівні клітин, тканин, органів;
- 2) втрата здатності до вторинного диференціювання і регенерації рослин, набуття здатності рости без гормонів (це явище частіше спостерігається у старих культур);
- 3) нормальний онтогенез калусних клітин, що закінчується їх старінням і смертю. Клітина зазнає вторинне диференціювання і припиняє ділитися (стаціонарна фаза).

У культурі калусних тканин виникнення організованих структур з неорганізованої маси клітин називають **морфогенезом**. Існують різні типи морфогенезу: органогенез – кореневий, стебловий, флоральний, листовий, соматичний ембріогенез (утворення зародкоподібних структур із соматичних клітин) (рис. 4). У разі органогенезу спочатку регенерують окремі органи, а потім вже з них – цілі рослини, виняток – кореневий органогенез.



**Рис. 4.** Морфогенез в калусних тканинах, сформованих в культурі незрілих зародків ячменю (а-в) і пшениці (z): а – ризогенез, б, z – стеблогенез, в – стебло- і ризогенез

Вторинне диференціювання калусних клітин не завжди закінчується морфогенезом і регенерацією рослин. Іноді це гістодиференціювання. Таким шляхом клітина калуса може перетворюватися у флоемні і ксилемні елементи тощо.

Для управління морфогенезом використовуються зовнішні і внутрішні чинники: внутрішні – вид рослини, генотип, орган, з якого взято експлант; зовнішні – склад живильного середовища, температура, світло (інтенсивність, спектр, довжина фотоперіоду).

Сигналом (імпульсом) морфогенезу є зміна співвідношення цитокинінів і ауксинів, тобто вони не тільки регулятори росту, але і диференціювання. Морфогенез починається з того, що під впливом умов середовища детермінована клітина відокремлюється від калусних клітин, утворюючи потовщену стінку.

Від недетермінованих калусних клітин ініціальна клітина відрізняється більш великим ядром і меншими розмірами вакуолі. Ядро зазвичай займає центральне положення. В ініціальних клітинах містяться великі кількості крохмалю, іноді ліпідів.

Деякий час ініціальна клітина знаходиться в лаг-фазі, що необхідно для перебудови і підготовки до наступних швидких поділів. Потім ці клітини діляться за типом дроблення, утворюючи сферичну масу дрібних ізодіаметричних клітин. Надалі в меристематичному вогнищі диференціюються зачатки стебла, кореня, листка чи квіткової бруньки і, відповідно, відбувається стебловий, кореневий, листовий і флоральний органогенез.

## 4. СУСПЕНЗІЙНІ КУЛЬТУРИ

Суспензійні культури – це одиночні клітини, дрібні, середні і великі агрегати (групи клітин), що вирощуються в рідкому живильному середовищі при постійній аерації в асептичних умовах.

Суспензії одержують із калусів. Для ініціації суспензійної культури необхідно 2-3 г свіжої пухкої маси калусних клітин на 60-100 мл рідкого поживного середовища. Первинну суспензію культивують в колбах з рідким живильним середовищем на кругових качалках зі швидкістю 100-120 об / хв.

Основною умовою культивування клітинних суспензій є постійне струшування або перемішування середовища. Інакше знову формується калусна тканина. Поділ підтримується присутністю ауксинів і цитокинінів, які необхідні для індукції і росту калусних тканин.

Призначення суспензій – отримання вторинних метаболітів (ліків, парфумерія, біомаса, селекція і протопласти). Суспензії використовують для отримання важливих хімічних речовин: органічних кислот, ферментів, алкалоїдів, барвників, білків, амінокислот, які застосовуються у фармакології, парфумерії, харчовій та хімічній промисловості, сільському господарстві.

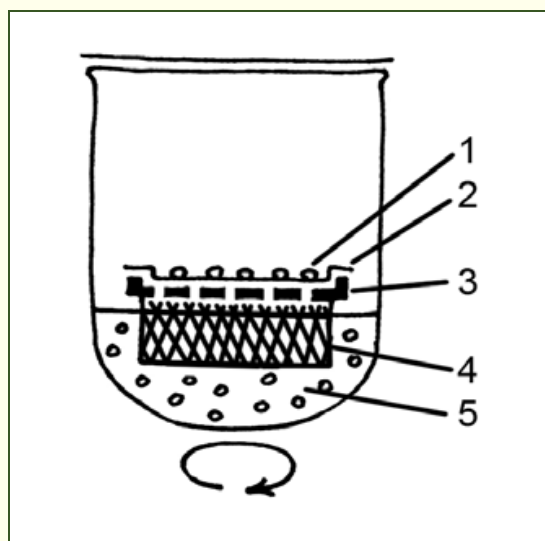
Суспензійні культури мають велике значення для генетики і особливо молекулярної біології: з суспензійних клітин отримують протопласти, необхідні для соматичної гібридизації, генетичної інженерії, а також для вивчення метаболізму клітин.

## 5. КУЛЬТУРА ОКРЕМИХ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН, АБО КУЛЬТУРА ПООДИНОКИХ КЛІТИН

Отримання культури окремих ізольованих клітин дуже цінна для генетичних і фізіологічних досліджень, практичного використання в клітинній селекції. Так, отримання клону потомства одиночної клітини допомагає встановити причини генетичної неоднорідності калусних клітин.

Одиночні клітини виділяють з клітинних суспензій, тканин рослин, з калусних тканин або культури протопластів після відновлення клітинної оболонки.

Перші роботи з ізоляції клітин рослин і отримання ізольованих клонів було виконано в 1954 р. у Вісконсінському університеті, США. Окремі клітини виділяли з пухкої калусної тканини тютюну, культивованої в рідкому живильному середовищі при постійному струшуванні на шейкері. Однак виникали труднощі пов'язані з тим, що окремі клітини не діляться в тих умовах, при яких росте калусна тканина. Однак клони з таких клітин вдалося отримати М'юїру зі співавторами з використанням **методу тканини-«няньки»** (рис. 5). У цьому випадку ізольовану клітину змочену живильним середовищем переносили на фільтрувальний папір, що розміщений поверхні калусної тканини. Калусна тканина індукувала і підтримувала поділ одиночних клітин, а потім і розвиток клітинного клону. У тих же цілях використовують суспензійні культури клітин.



**Рис. 5.** Використання в якості «няньки» культури суспензійних клітин при вирощуванні поодиноких клітин: 1 – колонії клітин; 2 – фільтрувальний папір, 3 – алюмінієва сітка, 4 – пінополіуретан; 5 – суспензія клітин

Для індукції клітинних поділів поодиноких клітин можна використовувати **«годуєчий» шар** (клітини суспензійної культури того ж виду рослин, що активно діляться), відділений від культивованих поодиноких клітин напівпроникною мембраною.

Пізніше був розроблений метод масового культивування окремих ізольованих клітин – **метод плейтінга** (від *plate* – чашка). Метод складається з наступних процедур:

- Отримання клітинної суспензії в рідкому живильному середовищі з добре ростучих калусних тканин.
- Фільтрування суспензії через сито для видалення великих клітинних агрегатів.
- Приготування 0,6-1%-го агарового середовища того ж складу, який був використаний для підтримки росту суспензії.
- Нагрівання агарового середовища до рідкого стану і перемішування її з рівною кількістю суспензії, яку необхідно розлити в чашки Петрі шаром близько 1 мм.
- Визначення місцеположення окремих клітин з використанням мікроскопу і нанесення позначок про їх наявність на кришках чашок.
- Культивування в темряві при  $t = 25^{\circ} \text{C}$ .
- Спостереження за розвитком одноклітинних клонів.



При даному способі культивування, навіть при недостатньо збалансованому складі живильного середовища, може відбуватися розподіл окремих клітин. Це обумовлено тим, що в сусідніх колоніях, утворених з дрібних клітинних агрегатів, синтезуються ростові речовини, які виділяються в середовище і стимулюють клітинний поділ.

## **6. УМОВИ ТА МЕТОДИ КУЛЬТИВУВАННЯ РОСЛИННИХ КЛІТИН І ТКАНИН *IN VITRO***

Будь-яка тканина рослин – це сукупність клітин, і якщо вона ізольована (виділена) з цілого організму, то позбавлена його регулюючого впливу і харчування. Отже, одним із принципів методу культури тканин (клітин) є відтворення *in vitro* умов, близьких або ідентичних тим, в яких клітини знаходяться на материнській рослині, для забезпечення їх повноцінного харчування і розвитку. Тоді при строгому дотриманні цих умов в культурі тканин будуть розмножуватися (регенерувати) ідентичні вихідному генотипу клітини і рослини.

Однак якщо такі умови досягаються і відтворюються не в повній мірі, то клітина виявляється у відносно інших фізико-хімічних умовах, що призводить до тимчасової та якісної зміни в реалізації її генетичної інформації. Зміщуючи в експерименті тимчасову реалізацію генетичної інформації (за допомогою гормональних впливів), можна спостерігати її модифікацію, а під впливом різних екстремальних трансформуючих факторів можливо її зміну в потрібному напрямку.

Клітина в умовах культури *in vitro* проявляє цитогенетичну нестійкість, в результаті цього виникають клітини з генетичною гетерогенністю, з'являються мутанти зі зміненим морфогенезом, які можуть бути вихідним матеріалом для селекції.



## **6.1. Склад поживних середовищ і роль їх окремих компонентів**

Поживні середовища для культивування ізолюваних клітин і тканин рослин повинні включати всі необхідні неорганічні елементи: макроеlementи (азот, фосфор, калій, кальцій, магній, сірка), мікроелементи (залізо, бор, марганець, цинк, мідь, молібден і ін.), а також органічні елементи: вітаміни, вуглеводи, амінокислоти).

Залежно від консистенції існує поділ на рідкі та тверді поживні середовища.

Для приготування твердих поживних середовищ використовують агар-агар (0,7-1%), який являє собою полісахарид, що одержують з морських водоростей. Агар забезпечує дифузю поживних елементів з середовища в культивовані тканини.

Крім джерел вуглецю, азоту та інших мінеральних компонентів, середовище для культивування тканин рослини, повинне містити специфічні стимулятори і регулятори росту: фітогормони або їх синтетичні аналоги.

Відомі три класи фітогормонів, що діють переважно як **стимулятори** (ауксини, гібереліни, цитокініни), і два класи фітогормонів, що мають **інгібуючу дію** (абсцизова кислота, етилен).

## **6.2. Стерилізація живильних середовищ**

Багате поживне середовище – прекрасний субстрат для розвитку в ньому мікроорганізмів. Для знезараження поживних середовищ використовують хімічний вплив (дезінфекція), вплив температури та інших фізичних факторів (ультразвук, ультрафіолетові промені, ультрафільтрація).

У біотехнології широко використовують термічні методи знезараження (автоклавування, стерилізацію, кип'ятіння, пастеризацію та ін.).

Високі, але короткочасні температурні режими інактивують спори бактерій, надаючи мінімальний вплив на біологічно активні компоненти середовища. У лабораторних умовах стерилізацію поживних середовищ та деяких інших об'єктів проводять в автоклавах парою під тиском, дотримуючись необхідні режими. В окремих випадках вдаються до сухожарові стерилізації.

### **6.3. Основні вимоги до умов культивування**

Всі маніпуляції з культурою ізольованих тканин рослин проводяться в стерильних умовах. Комплекс заходів, що забезпечують асептику біотехнологічних процесів, включає механічний, фізичний та хімічний захист біооб'єкту і середовища його існування, а при необхідності – і кінцевого продукту. Асептика передбачає вологе прибирання приміщень, обробку їх ультрафіолетовими променями, антисептичними засобами, використання стерильних інструментів, середовищ, технологічного одягу, подачу стерильного повітря (столи з ламінарним потоком стерильного повітря в боксованих приміщеннях, надходження в ферментатор стерильного повітря через барботер – (від франц. barbotage – перемішування) та ін.

До *механічного* захисту відносяться видалення механічних домішок, наприклад, з повітря, культиваторів; герметизація устаткування, ізоляція вузлів і з'єднань; до *фізичного* – обробка повітря і поверхонь приладів і апаратів ультрафіолетовими променями, кип'ятіння, стерилізація парю під тиском, обробка ультразвуком; до *хімічного* – обробка робочих поверхонь і біооб'єктів хімічними антисептиками.

Культивування ізольованих тканин рослин відбувається на **світлі**. Освітленість світлової кімнати повинна становити залежно від культури 1000-10000 лк. Необхідно враховувати фотоперіод, який потрібно для даного культивованого об'єкту.

**Вологість** в світловій кімнаті повинна бути 60-70%. Більш сухе повітря сприяє всиханню живильного середовища в пробірках і колбах, особливо якщо вони закриті ватними пробками, зміни її концентрації, а значить, і порушення умов культивування. Для підвищення вологості в кімнаті можна використовувати піддони з водою.

**Оптимальна температура** для більшості культивованих тканин – 25-26°C, для культури тканин тропічних рослин – 29-30 °C. У випадку індукції морфогенезу температуру знижують до 18-20 °C.

## 7. ПРОТОПЛАСТИ РОСЛИННИХ КЛІТИН ЯК ОБ'ЄКТ БІОЛОГІЧНОГО КОНСТРУЮВАННЯ

### 7.1. Способи отримання і культивування протопластів

Протопласт – клітина, позбавлена целюлозної оболонки, оточена мембраною цитоплазми, яка зберігає всі властивості, характерні рослинній клітині.

Вперше протопласти в 1892 р. виділив Дж. Клеркер, який використовував **механічний** спосіб. При цьому способі у плазмолізованих клітин розрізають клітинну стінку і протопласти виходять в середовище. В даний час метод зазнав модифікації, але має ряд недоліків.

Інший метод виділення протопластів – **ензиматичний**, з використанням ферментів. У 1952 році Салтон за допомогою ферменту лізоциму вперше зруйнував клітинну оболонку бактерій. У 1960 році Коккінг обробив кінчики коріння томату гідролітичним ферментом з культуральної рідини цвілевих грибів (*Myrothecium verrucaria*) і вперше отримав ізольовані протопласти вищих рослин ензиматичним способом.

**Ензиматичний метод в порівнянні з механічним має ряд переваг:**

- одночасно виділяється велика кількість протопластів (до 10 млн. з 1 гр тканини або клітин);
- клітини не піддаються сильному осмотичному стресу;
- клітини не ушкоджуються;
- метод порівняно швидкий.

Для видалення клітинної оболонки використовують ферменти трьох типів: целюлази, геміцелюлази і пектинази. Комбінація ферментів і їх співвідношення специфічне для кожного типу клітин.

Виділення протопластів проводять в три етапи:

- обробка ферментами;
- виділення протопластів з клітинних оболонок;
- відділення інтактних протопластів від клітинних осколків.

У ізольованих протопластів проблемою стає регуляція водообміну клітини, яка в першу чергу пов'язана з наявністю клітинної оболонки, тому важливого значення набувають осмотичні властивості середовища культивування. Середовище повинне бути злегка гіпертонічним, щоб протопласти знаходилися в плазмолізованому стані. Ці умови гальмують метаболізм і регенерацію клітинної оболонки. В якості осмотичних стабілізаторів використовують цукри (глюкоза, маніт, сорбіт, ксилоза), іонні осмотики ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ) в концентрації 0,3-0,8 моль/л. Концентрації підбираються індивідуально для кожного рослинного об'єкту.

Після обробки клітини ферментами їх потрібно відмити від ферментів. Відокремити протопласти від ферментативної суміші можна двома способами: або **фільтрація з центрифугуванням**, або **флотація**.

При **фільтрації** суміш пропускають через фільтри з розмірами пор 40 мкм. На фільтрі при цьому залишаються грудки клітин і їх великі уламки. При подальшому центрифугуванні осідають протопласти, уламки залишаються в супернатанті. При повторному центрифугуванні йде відмивання від ферменту, після чого протопласти переносяться в середовище для культивування.

Метод **флотації** запропонований О. Гамборгом із співробітниками в 1981 році і призначається для ослаблених протопластів. Він заснований на тому, що протопласти мають нижчу щільність, ніж органела або залишки клітинних оболонок. До початкової суміші додають розчин сахарози і центрифугують при швидкості від 40-80 до 350 г. Чисті протопласти спливають, а залишки осідають на дно.

Далі протопласти культивують в тих же умовах, що і клітини. Склад солей може бути дещо змінений. Середовище складається з осмотичного стабілізатора, неорганічних сполук, джерела вуглецю, азоту, вітамінів, фітогормонів.

Відразу після того, як відмиті ферменти, протопласти починають регенерувати клітинну оболонку. З'являються целюлозні мікрофібрили, які поступово організовуються в типову клітинну оболонку. Через 2-4 дні протопласти можуть втратити сферичну форму і повністю відновлюється клітинна оболонка. В залежності від походження протопластів і культуральних умов може відзначатися відсутність синтезу клітинної оболонки.

нки протягом декількох тижнів або місяців. Одним з факторів культурального середовища, що обумовлює синтез клітинної оболонки, є сахароза. У її відсутності синтез клітинної оболонки не відбувається.

## **7.2. Застосування ізольованих протопластів**

Протопласти є унікальною моделлю для вивчення фундаментальних фізіологічних проблем у рослин. Вони незамінні при вивченні складу, структури і функціонування плазмалеми в нормі і при дії на неї гормонами, інгібіторами, фітототоксинами, а також при взаємодії самих протопластів в популяції. Крім того, протопласти можуть використовуватися для визначення складу і архітекtonіки первинної клітинної оболонки і вивчення механізму її репарації після руйнування.

Ізольовані протопласти мають ряд областей застосування, як теоретичного, так і прикладного характеру:

1. Вивчення хімічного складу і структури клітинної оболонки (і при руйнуванні, і при синтезі «de novo»).
2. Вивчення властивостей плазмалеми, трансмембранних переміщень.
3. «М'яке» виділення органели.
4. Спостереження за закономірностями диференціювання клітин при злитті протопластів, спостереження взаємодії ядра і цитоплазми в отриманій гібридній клітині, вивчення соматичних гібридів.
5. Введення чужої органели.
6. Введення чужорідних генів в рослинну клітину (трансгенез).

## **7.3. Злиття протопластів (парасексуальна гібридизація)**

Ізольовані протопласти, що ще не утворили клітинної оболонки, можуть зливатися між собою. Злиття протопластів – своєрідний метод гібридизації, так звана **парасексуальна, або соматична гібридизація**. На відміну від звичайної, де зливаються статеві клітини (гамети) при парасексуальній гібридизації використовуються диплоїдні клітини рослин.

Техніка парасексуальної гібридизації може дозволити:

- схрещування філогенетично віддалених видів рослин (організмів);

- отримання асиметричних гібридів, що несуть генний набір одного з батьків разом з декількома хромосомами, органелою або цитоплазмою іншого;
- злиття трьох і більше клітин;
- отримання гібридів, що представляють суму генотипів батьків;
- переведення мутацій в гетерозиготний стан, що дозволяє отримувати життєздатні форми при злитті протопластів.

## 8. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ І ОЗДОРОВЛЕННЯ РОСЛИН

У природі існує два способи розмноження рослин: статеве (насінове) і вегетативне.

Більшість видів, зокрема деревні породи, погано розмножуються вегетативним способом. Наприклад, не дуже висока ефективність вегетативного розмноження дуба, сосни, ялики, горіхоплідних. За допомогою черенкування неможливо розмножувати багато деревних рослин у віці старше 10-15 років. Крім того, розмноження за допомогою щеплень складні і трудомісткі.

Досягнення в області культури клітин і тканин призвели до створення принципово нового методу вегетативного розмноження – *клонального мікророзмноження*.

**Клональне мікророзмноження** – отримання *in vitro* нестатевим шляхом, генетично ідентичних початковому екземпляру рослин.

У основі методу лежить унікальна здатність рослинної клітини реалізувати властиву їй тотипотентність. Термін "клон" був запропонований в 1903 році Уебстером (від грецького *klon* – живець або пагін, придатний для розмноження рослин). Відповідно до наукової термінології клонування має на увазі отримання ідентичних організмів з одиничних клітин.

Цей метод має ряд переваг перед існуючими традиційними способами розмноження:

- отримання генетично однорідного посадкового матеріалу;



- звільнення рослин від вірусів за рахунок використання меристемної культури;
- високий коефіцієнт розмноження (105-106 – для трав'янистих, квіткових рослин, 104-105 – для чагарникових деревних рослин і 104 – для хвойних);
- скорочення тривалості селекційного процесу;
- прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
- розмноження рослин, що важко розмножуються традиційними способами;
- можливість проведення робіт протягом всього року;
- можливість автоматизації процесу вирощування.

### **Етапи мікроклонального розмноження рослин:**

Процес клонального мікророзмноження можна розділити на 4 етапи:

1. Вибір рослини-донора, ізолювання експлантів і отримання стерильної культури, яка добре росте.
2. Власне мікророзмноження, коли досягається отримання максимальної кількості меристематичних клонів.
3. Вкорінення розмножених пагонів з подальшою адаптацією їх до ґрунтових умов, а при необхідності депонування рослин-регенерантів при зниженій температурі (+2 °С, +10 °С).
4. Вирощування рослин в умовах теплиці і підготовка їх до реалізації або посадки в полі.

Для культивування тканин на кожному з чотирьох етапів потрібне застосування певного складу живильного середовища.

На **першому етапі** необхідно добитися отримання стерильної культури. У тих випадках, коли важко отримати початкову стерильну культуру експланта, рекомендується вводити до складу живильного середовища антибіотики (тетрациклін, бензилпеніцилін і ін.) в концентрації 100-200 міліграм/л. Це в першу чергу відноситься до деревних рослин, у яких спостерігається тенденція до накопичення внутрішньої інфекції.

На першому етапі, як правило, використовують середовище, що містить мінеральні солі по рецепту Мурасига і Скуга, а також різні біологіч-



но активні речовини і стимулятори росту (ауксини, цитокініни) в різних поєднаннях залежно від об'єкту. У тих випадках, коли спостерігається інгібування росту первинного експланта, за рахунок виділення ним в живильне середовище токсичних речовин (фенолів, терпенів і інших вторинних сполук), зняти його можна, використовуючи антиоксиданти. Це можливо двома способами: або промиванням експланта слабким його розчином протягом 4-24 год, або безпосереднім додаванням в живильне середовище. Як антиоксиданти використовують: аскорбінову кислоту (1 міліграм/л), глутатіон (4-5 міліграм/л), дитіотриетол (1-3 міліграм/л), диетилдитіокарбомат (2-5 міліграм/л), полівінілпіролідон (5000-10000 міліграм/л). В деяких випадках доцільно додавати в живильне середовище адсорбент – деревне активоване вугілля в концентрації 0,5- 1%. Тривалість першого етапу може коливатися від 1 до 2 місяців, в результаті якого спостерігається ріст меристематичних тканин і формування первинних пагонів.

На **другому етапі** необхідно добитися отримання максимальної кількості мериклонів, враховуючи при цьому, що із збільшенням субкультувань збільшується число рослин-регенерантів з ненормальною морфологією і можливо спостерігати утворення рослин-мутантів.

Як і на першому етапі, використовують живильне середовище по рецепту Мурасига і Скуга, що містить різні біологічно активні речовини, а також регулятори росту. Основну роль при підборі оптимальних умов культивування експлантів відіграють співвідношення і концентрація внесених до живильного середовища цитокінінів і ауксинів. З цитокінінів найчастіше використовують БАП в концентраціях від 1 до 10 міліграма/л, а з ауксинів ІОК і НОК в концентраціях до 0,5 міліграм/л.

При довгому культивуванні рослинних тканин на живильних середовищах з підвищеним вмістом цитокінінів (5-10 міліграм/л) відбувається поступове накопичення їх в тканинах вище за необхідний фізіологічний рівень, що призводить до появи токсичної дії і формування рослин із зміненою морфологією. Разом з тим, можливо спостерігати такі небажані для клонального мікророзмноження ефекти, як пригнічення проліферації пазух меристем, утворення вітрифікованих (оводнених) пагонів і зменшення здатності рослин до вкорінення. Негативну дію цито-

кінинів можливо подолати, за даними Н.В. Катаєвої і Р.Г. Бутенко, шляхом використання живильних середовищ з мінімальною концентрацією цитокінінів, що забезпечують стабільний коефіцієнт мікророзмноження, або шляхом чергування циклів культивування на середовищах з низьким і високим рівнем фітогормонів.

На **третьому етапі**, як правило, змінюють основний склад середовища: зменшують в два, а іноді і в чотири рази концентрацію мінеральних солей по рецепту Мурасига і Скуга або замінюють її середовищем Уайта, зменшують кількість цукру до 0,5-1% і повністю виключають цитокініни, залишаючи один лише ауксин. Як стимулятор коренеутворення використовують  $\beta$ -індоліл-3-масляну кислоту (ІМК), ІОК або НОК.

### **Вкорінення мікропагонів проводять двома способами:**

- 1) витримка мікропагонів протягом декількох годин (2-24 год) в стерильному концентрованому розчині ауксину (20-50 міліграм/л) і подальше їх культивування на агаризованому середовищі без гормонів або безпосередньо у відповідному ґрунтовому субстраті (імпульсна обробка);
- 2) безпосереднє культивування мікропагонів протягом 3-4 тижнів на живильному середовищі, що містить ауксин в невисоких концентраціях (1-5 міліграм/л залежно від досліджуваного об'єкту). Останнім часом запропонований метод вкорінення пробірних рослин в умовах гідропоніки. Цей метод дозволяє значно спростити етап вкорінення і одночасно отримувати рослини, адаптовані до природних умов. Для картоплі можливо використовувати безсубстратну гідропоніку для отримання міні-бульб. Затінювання нижньої частини культуральних посудин щільною чорною матерією або додавання в живильне середовище активованого вугілля сприяє вкоріненню мікропагонів.

Пересадка рослин-регенерантів в субстрат є відповідальним етапом, що завершує процес клонального мікророзмноження. Найбільш сприятливий час для пересадки пробірних рослин – весна або початок літа.

Рослини з двома-трьома листками і добре розвиненою кореневою системою обережно виймають з колб або пробірок пінцетом з довгими кінцями або спеціальним гачком. Коріння відмивають від залишків агару і висаджують в ґрунтовий субстрат, заздалегідь простерилізований при

85-90 °С протягом 1-2 год. Для більшості рослин як субстрати використовують торф, пісок (3:1); торф, дерновий ґрунт, перліт (1:1:1); торф, пісок, перліт (1:1:1). Виняток становлять родина орхідних, для яких готують субстрат, що складається з сфагнового моху, суміші торфу, листя буку або дуба, соснової кори (1:1:1).

Приготованим заздалегідь ґрунтовим субстратом заповнюють пікірувальні ящики або торф'яні горщики, в яких вирощують рослини-регенеранти. Горщики з рослинами поміщають в теплиці з регульованим температурним режимом (20-22 °С), освітленістю не більше 5 тис. лк і вологістю 65-90%. Для кращого росту рослин створюють умови штучного туману. У тих випадках, коли немає можливості створити такі умови, горщики з рослинами накривають скляними банками або поліетиленовими пакетами, які поступово відкривають до повної адаптації рослин.

Через 20-30 днів після посадки добре укорінені рослини підготовують розчинами мінеральних солей Кнудсона, Мурасига і Скуга, Чеснокова, Кнопа (залежно від виду рослин) або комплексним мінеральним добривом. У міру росту рослин їх розсаджують у великі ємності зі свіжим субстратом. Подальше вирощування акліматизованих рослин відповідає прийнятій агротехніці вирощування для кожного індивідуального виду рослин.

Процес адаптації пробірних рослин до ґрунтових умов є найбільш дорогою і трудомісткою операцією. Нерідко після пересадки рослин в ґрунт спостерігається зупинка в рості, опадання листя і загибель рослин. Ці явища зв'язані, в першу чергу, з тим, що у пробірних рослин порушена діяльність продихового апарату, унаслідок чого відбувається втрата великої кількості води. По-друге, у деяких рослин в умовах *in vitro* не відбувається утворення корневих волосків, що призводить, у свою чергу, до порушення поглинання води і мінеральних солей з ґрунту. Тому доцільно на третьому або четвертому етапах клонального мікророзмноження застосовувати штучну мікоризацію рослин (для мікотрофних), враховуючи їх позитивну роль в постачанні рослин мінеральними і органічними живильними речовинами, водою, біологічно активними речовинами, а також в захисті рослин від патогенів.

Індійськими ученими запропонований простий метод запобігання швидкому обезводненню листя рослин, вирощених *in vitro*, під час їх пере-

садки в польові умови. Метод полягає в тому, що листя протягом всього акліматизаційного періоду слід обприскувати 50%-м водним розчином гліцерину або сумішшю парафіну, або жиру в діетиловому ефірі (1:1). Застосування цього методу допомагає уникнути довгих і скрутних процесів загартовування пробірних рослин і забезпечує 100%- їх приживаність.

### **Методи клонального мікророзмноження.**

Існує багато методів клонального мікророзмноження, а також різних їх класифікацій.

Н.В. Катаєва і Р.Г. Бутенко (1983) виділяють два принципово **різних типи клонального мікророзмноження:**

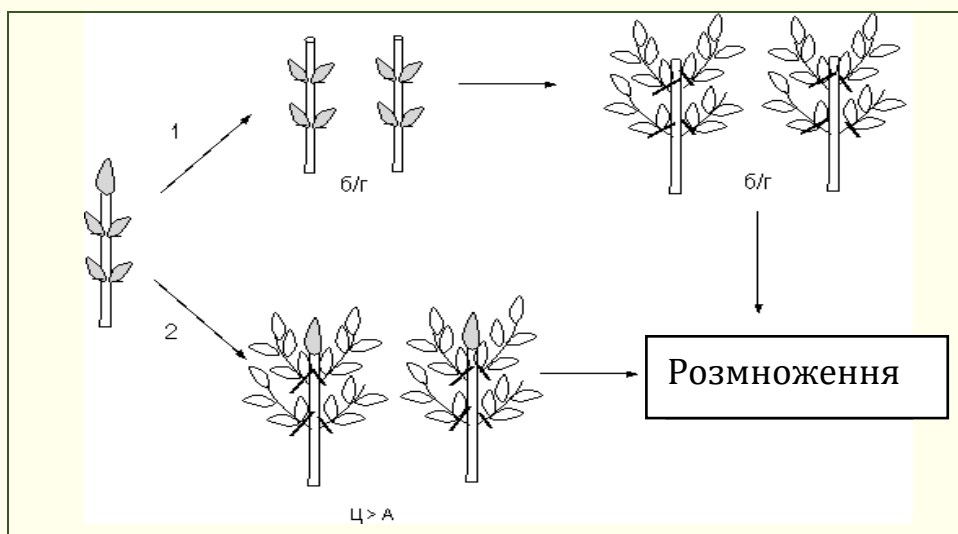
1. Активація меристем, що вже існують в рослині (апекс стебла, пазухові і сплячі бруньки стебла).
2. Індукція виникнення бруньок або ембріодів *de novo*:
  - утворення адвентивних пагонів безпосередньо тканинами експланта;
  - індукція соматичного ембріогенезу;
  - диференціація адвентивних бруньок в первинній і пересадковій калусній тканині.

**1. Активація розвитку меристем, що вже існують в рослині** – основний метод, що використовується при клональному мікророзмноженні рослин. Він заснований на знятті апікального домінування (рис. 6). Цього можна досягти двома шляхами:

- а) видаленням верхівкової меристеми стебла і подальшим мікрочеренкуванням пагона *in vitro* на безгормональному середовищі;
- б) додаванням в живильне середовище речовин цитокінінового типу дії, що індукують розвиток численних пагонів пазух. Як правило, з цитокінінів використовують 6-бензиламінопурин (БАП) або 6-фурфуриламинопурин (кінетин) і зеатин.

Отримані таким чином пагони відокремлюють від первинного експланта і знову самостійно культивують на свіжоприготовленому живильному середовищі, що стимулює проліферацію пазух меристем і виникнення пагонів вищих порядків.

В даний час цей метод широко використовується у виробництві посадочного матеріалу сільськогосподарських культур, як технічних, так і овочевих, а також для розмноження культур промислового квітникарства (наприклад, гвоздики), тропічних і субтропічних рослин, плодових і ягідних культур, деревних рослин. Для деяких культур, таких як картопля, технологія клонального розмноження поставлена на промислову основу. Застосування методу активації розвитку існуючих меристем дозволяє отримувати з однієї меристеми картоплі більше 100000 рослин в рік, причому технологія передбачає отримання в пробірках мікробульб – цінного безвірусного насінневого матеріалу.



**Рис. 6.** Схема розмноження рослин методом активації вже існуючих меристем (по А. Р. Родіну, Е. А. Калашникової, 1993): 1 – шляхом видалення верхівкової меристеми, 2 – додаванням цитокінінів в середовище (б/г – середовище без гормонів, Ц – цитокінін, А – ауксин)

## **2. Індукція виникнення бруньок або ембріоїдів de novo:**

Першим з цього методу є – **індукція виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експланта**. Він заснований на здатності ізольованих частин рослини за сприятливих умов живильного середовища відновлювати бракуючі органи і таким чином регенерувати цілі рослини. Можна добитися утворення адвентивних бруньок майже з будь-яких органів і тканин рослини (ізольованого зародка, листка, стебла, сім'ядолей, лусочок і дна цибулин, сегментів коріння і зачатків суцвіть). Цей процес відбувається на живильних середовищах, що містять цитокініни в співвідношенні з ауксинами 10:1 або 100:1. З ауксинів використовують ІОК або НОК.

У такий спосіб було розмножено багато представників родини лілійних, томати, деревні рослини (із зрілих і незрілих зародків).

**Другий метод**, що практикується при клональному мікророзмноженні, ґрунтується на диференціації з соматичних клітин зародкоподібних структур, які своїм виглядом нагадують зиготичні зародки. Цей метод отримав назву **соматичного ембріогенезу**. Згідно Стеварду, соматичні зародки проходять 3 стадії розвитку: глобулярну, серцеподібну, торпедоподібну і зрештою мають тенденцію розвитку в проросток.

Найбільш вражаючим застосуванням методу соматичного ембріогенезу стало розмноження гвінейської олійної пальми (*Elaeis guineensis*), масло якої широко використовується при виробництві маргарину і харчового масла. Олійна пальма в природі не утворює пагонів і бічних паростків, що утруднює її вегетативне розмноження. Культивування живців *in vitro* також неможливе. Було вирішено отримати скупчення клітин недиференційованої тканини (калус) шляхом дедиференціювання специфічних тканин, а потім культивувати їх до регенерації цілих проростків.

**Третій метод** клонального мікророзмноження – **диференціація адвентивних бруньок в первинній і пересадковій калусній тканині**.

Практично він мало використовується з метою отримання посадкового матеріалу *in vitro*. Це пов'язано з тим, що при частому пасивуванні калусної тканини може змінюватися плоідність регенерованих рослин, спостерігаються структурні перебудови хромосом і накопичення генних мутацій. Разом з генетичними змінами відмічаються і морфологічні: низкорослість, неправильне жилкування листків, утворення укорочених міжвузлів, знижена стійкість до хвороб і шкідників. В той же час, деякі недоліки цього методу в селекційній роботі обертаються перевагами.

Крім того, в деяких випадках він є єдино можливим способом розмноження рослин в культурі тканин. Через калусну культуру успішно розмножуються цукровий буряк, злакові, представники роду *Brassica*, соняшник та інші культури.

Основна перевага клонального мікророзмноження – отримання генетично однорідного, безвірусного посадкового матеріалу. Припущення про можливість відсутності вірусів в меристематичних тканинах хворих рослин вперше було висловлене в 1936 р. Чунгом, а пізніше, в 1943 р., і



Уайтом. У 1949 р. цей факт був підтверджений експериментально. У 1952 р. Морелю і Мартену з Національного агрономічного інституту (Франція) вдалося отримати безвірусні жоржини із заражених рослин.

## **9. МЕТОДИ ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ. МЕТОДИКА КРІОКОНСЕРВАЦІЇ, СПОСОБИ УПОВІЛЬНЕННЯ РОСТУ**

При отриманні клітинних ліній з корисними ознаками стає проблема збереження цих ознак. Рослини можуть зберігати генетичну інформацію в насінні, проте це джерело не цілком надійне, оскільки з часом через мутації схожість насіння падає. Крім того, деякі рослини розмножуються тільки вегетативно. Цим обумовлена необхідність збереження частини матеріалу *in vitro*. З іншого боку, в деяких випадках вдається отримати нові клітинні лінії, що синтезують більшу кількість вторинних метаболітів, тобто продуктивніші, які теж потребують збереження.

Для дослідження фізіологічних і біохімічних процесів, що протікають в тканинах, також потрібні стандартні початкові культури, чим викликана необхідність зберігати матеріал протягом певного проміжку часу, коли йдуть серійні експерименти. Все це робить проблему збереження генофонду вельми актуальною.

**Існують різні підходи до збереження культур:**

- кріозбереження;
- уповільнення росту.

**Кріозбереження** – заморожування матеріалу при наднизьких температурах. Зазвичай його проводять в рідкому азоті, при температурі  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Успіх низькотемпературної консервації залежить від ряду чинників:

- виду і типу клітин;
- їх концентрації в суспензії;
- складу середовища для консервації;
- виду і концентрації кріопротектору;



- режиму охолодження і відігрівання;
- способу реабілітації клітин після відігрівання.

Істотну роль в успішному заморожуванні клітин відіграє їх морфофізіологічний стан: клітини, що знаходяться в стаціонарній фазі росту, менш стійкі до пошкоджуючої дії низькотемпературної консервації, ніж клітини, що знаходяться в експоненціальній фазі росту. Клітини для заморожування відбирають в середині експоненціальної фази ростової кривої.

Для рослинних клітин часто потрібне попереднє культивування в особливих умовах. В середовище додають різні речовини, наприклад:

- 2-6% маніт або сорбіт для зменшення розміру вакуолей;
- амінокислоти, в першу чергу пролін, який служить для затримки води в клітині, аспарагін,  $\gamma$ -аміномасляну кислоту;
- крім того, застосовують штучне загартовування до холоду, коли знижують температуру культивування, імітуючи природний осінній процес підготовки до періоду зимового спокою. Клітинні культури витримують декілька діб при температурі  $+8 - +10^{\circ}\text{C}$ , а потім при  $+2 - +5^{\circ}\text{C}$  протягом 1-6 тижнів.

Процес заморожування рослинних клітин від тваринних відрізняє, в основному, наявність етапу попереднього культивування.

Кріопротектори – речовини, що дозволяють понизити пошкоджуючу дію фізико-хімічних чинників при кріоконсервуванні. До них відносяться сахароза, декстран, етилгліколь, полівінілпіролідон, диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин. Для визначення токсичності кріопротектора клітини витримують при кімнатній температурі в різних його концентраціях протягом 30-50 хвилин, після чого визначають їх життєздатність.

Програми охолодження можуть бути різними, але для всіх них характерна повільна швидкість охолодження. При заморожуванні відбувається утворення льоду усередині і зовні клітин. Характер цих змін залежить від зразка, що вивчається, і обробки кріопротекторами, але головним чином, від швидкості охолодження. При повільному охолодженні відбувається утворення позаклітинного льоду, що приводить до обезводнення клітини до того, як буде досягнута точка замерзання цитоплазми. При швидкому охолодженні клітини швидше заморожуються зсередини, повільніше зневоднюються, що призводить до утворення

кристалів льоду усередині клітини. В цьому випадку клітини ушкоджуються. Звичайне охолодження проводять в два етапи:

**1-й етап:** від +20 до -28°C із швидкістю 1 градус в хвилину (для рослинних клітин швидкість заморожування 0,5 градуси в хвилину до -35 °C), витримують при цій температурі 15 хвилин.

**2-й етап:** занурення в рідкий азот (миттєве охолодження до -196 °C).

Заморожування проводять в спеціальних апаратах. При їх відсутності – на спиртовій лазні (0,5-1 літр спирту наливають в термос з металевою колбою, занурюють в нього ампули на 15 хвилин і додають при помішуванні рідкий азот або сухий лід; доводять температуру до -32°C (температура повинна бути не вище -28 і не нижче -32°C). Далі переносять ампули в рідкий азот.

При розморожуванні ампули пінцетом переносять у водяну лазню з температурою +37 – +40°C, ампула об'ємом в 1 мл розморожується протягом 0,5-1 хвилини.

Після розморожування клітини відмивають або в ростовому середовищі (тварини), або в підтримуючому середовищі. Рослинні клітини також можна відмивати 3-10% розчином сахарози.

Далі клітини перевіряють на життєздатність за допомогою вітальних фарбників, що забарвлюють мертві клітини. Остаточним критерієм служить чітке відновлення росту на стандартних живильних середовищах, використовуваних для даної культури.

**Уповільнення росту** можна добитися наступними методами:

1. Зберігання під шаром мінерального масла (для бактерійних і грибних культур).
2. Зміна газового складу і атмосферного тиску усередині культуральної посудини.
3. Зміна світлового режиму.
4. Охолодження до температури припинення активного росту.
5. Застосування гормональних і осмотичних інгібіторів. З гормональних інгібіторів найчастіше використовують хлорхолінхлорид (для рослинних клітин), з осмотичних – маніт в концентрації 3-6 .
6. Заміна  $\text{CaCl}_2$  на  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  в живильних середовищах.

## КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Яке значення, напрямки та можливості використання культури клітин і тканин рослин?
2. Що таке тотипотентність рослинної клітини?
3. Що таке культура калусних тканин?
4. Які зміни відбуваються у спеціалізованій клітині при переході до дедиференціації?
5. Із яких органів рослини можна отримати калусну тканину?
6. Які особливості калусних клітин?
7. Що таке клітинна суспензія та яке її практичне значення?
8. Калусній тканині якого типу надається перевага для отримання клітинної суспензії?
9. Що таке культура окремих ізольованих клітин, або культура поодиноких клітин?
10. Умови та методи культивування рослинних тканин *in vitro*.
11. Способи отримання і культивування протопластів.
12. Які області застосування ізольованих протопластів?
13. Що таке мікроклональне розмноження?
14. Назвіть основні переваги мікроклонального розмноження над традиційним.
15. Назвіть методи мікроклонального розмноження.
16. Назвіть етапи мікроклонального розмноження рослин.
17. При яких умовах проводять коренеутворення проростків при мікроклональному розмноженні суниці?
18. Мікроклональне розмноження і оздоровлення рослин.
19. Методи збереження генофонду. Методика кріоконсервації, способи уповільнення росту.

# ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ ВВЕДЕННЯ В ГЕНЕТИЧНУ ІНЖЕНЕРІЮ МОЖЛИВОСТІ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

## ПЛАН

1. Поняття генної інженерії.
2. Методи технології рекомбінантних ДНК.
3. Трансгенні рослини і тварини. Перспективи їх використання.
4. Генотерапія.

## 1. ПОНЯТТЯ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Важливою складовою частиною біотехнології є генетична інженерія. Народившись на початку 70-х років, вона добилася сьогодні великих успіхів. Методи генної інженерії перетворюють клітини бактерій, дріжджів і ссавців в «фабрики» для масштабного виробництва будь-якої речовини, особливо білка. Це дає можливість детально аналізувати структуру і функції білків і використовувати їх як лікарські засоби.

**Генетична інженерія** – конструювання *in vitro* функціонально активних генетичних структур (рекомбінантних ДНК), або інакше – створення штучних генетичних програм. Генетична інженерія – система експериментальних прийомів, що дозволяють конструювати лабораторним шляхом (у пробірці) штучні генетичні структури у вигляді так званих рекомбінантних або гібридних молекул ДНК. Під рекомбінантними розуміють ДНК, утворену об'єднанням *in vitro* (у пробірці) двох або більше фрагментів ДНК, виділеної з різних біологічних джерел.

**Генетична інженерія** – отримання нових комбінацій генетичного матеріалу шляхом маніпуляцій, що проводяться поза клітиною, з молекулами нуклеїнових кислот і перенесення створених конструкцій генів в

живий організм, в результаті якого досягається їх включення і активність в цьому організмі і у його потомства.

**Мета** прикладної генетичної інженерії полягає в конструюванні таких рекомбінантних молекул ДНК, які при впровадженні в генетичний апарат додавали б організму властивості, корисні для людини.

Наприклад, отримання «біологічних реакторів» – мікроорганізмів, рослин і тварин, що продукують фармакологічно значущі для людини речовини, створення сортів рослин і порід тварин з певними цінними для людини ознаками. Методи генної інженерії дозволяють провести генетичну паспортизацію, діагностувати генетичні захворювання, створювати ДНК-вакцину, проводити генотерапію різних захворювань.

Формально датою народження генетичної інженерії слід вважати **1972 рік, коли в Стенфордському університеті П. Берг, С. Коен, Х. Бойер** із співробітниками створили першу рекомбінантну ДНК, що містила фрагменти ДНК вірусу SV40 (поліомавірус – викликає розвиток пухлин, ним була заражена вакцина від поліомієліту у 1960 р.), бактеріофага і *E. coli*.

#### **Основні етапи вирішення завдань генної інженерії наступні:**

1. Отримання ізольованого гена.
2. Введення гена у вектор для перенесення в організм.
3. Перенесення вектора з геном в організм, що модифікується.
4. Перетворення клітин організму.
5. Відбір генетично модифікованих організмів (ГМО) і усунення тих, які не були успішно модифіковані.

Процес синтезу генів в даний час розроблений дуже добре і навіть в значній мірі автоматизований. Існують спеціальні апарати, забезпечені ЕОМ, в пам'яті яких закладають програми синтезу різних нуклеотидних послідовностей. Такий апарат синтезує відрізки ДНК завдовжки до 100—120 азотистих основ (олігонуклеотиди).

## 2. МЕТОДИ ТЕХНОЛОГІЇ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

Технологія рекомбінантних ДНК використовує наступні методи:

- специфічне розщеплювання ДНК рестрикційними нуклеазами;
- виділення і маніпуляції з окремими генами;
- швидке секвенування (визначення нуклеотидної послідовності) всіх нуклеотидів в очищеному фрагменті ДНК, що дозволяє визначити межі гена і амінокислотну послідовність, що кодується ним;
- конструювання рекомбінантної ДНК;
- гібридизація нуклеїнових кислот, що дозволяє виявляти специфічні послідовності РНК або ДНК з більшою точністю і чутливістю, засновану на їх здатності зв'язувати комплементарні послідовності нуклеїнових кислот;
- клонування ДНК: ампліфікація *in vitro* за допомогою ланцюгової полімеразної реакції або введення фрагмента ДНК в бактеріальну клітину, яка після такої трансформації відтворює цей фрагмент в мільйонах копій;
- введення рекомбінантної ДНК в клітини або організми.

### 2.1. Ферменти, що використовуються в генній інженерії

При роботі з макромолекулами ДНК і РНК ферменти виступають в ролі «скальпеля», «ножиць» і «ниток для зшивання».

Крім того, ферменти виконують функції реплікації ДНК (подвоєння), репарації пошкоджень (відновлення цілісності молекули), беруть участь в процесах прочитування і перенесення генетичної інформації з клітини в клітину або в її межах.

Завдання генного інженера – підібрати фермент, який виконав би поставлені завдання, тобто зміг би працювати з певною ділянкою нуклеїнової кислоти.

Слід зазначити, що ферменти, що використовуються в генній інженерії, позбавлені видової специфічності.

### Їх розділяють на декілька груп:

- ферменти, за допомогою яких отримують фрагменти ДНК (рестриктази);
- ферменти, що синтезують ДНК на матриці ДНК (полімерази) або РНК (зворотні транскриптази);
- ферменти, що сполучають фрагменти ДНК (лігази);
- ферменти, що дозволяють здійснити зміну структури кінців фрагментів ДНК.

## 2.2. Визначення нуклеотидної послідовності (секвенування) ДНК

Секвенування ДНК (від англ. «*sequence*» – послідовність) – визначення послідовності нуклеотидів у ланцюгу ДНК. Використовується для розшифровки генів і занесення цієї інформації до банку даних та її подальшої інтерпретації методами біоінформатики. Секвенування дозволяє досить швидко визначити повну нуклеотидну послідовність сегменту довжиною 100-500 нуклеотидних пар, що утворюється при розщеплюванні ДНК-рестрикційними ендонуклеазами.

**Історія секвенування ДНК.** Уперше геном був розшифрований у найпримітивніших живих істот – вірусів. Першими розшифровані ДНК вірусу натуральної віспи (1993), геном цитомегаловірусу, геном вірусу осповакцини, а також геноми органодів клітин еукаріотів – мітохондріальний геном і хлоропластний моху, хлоропластний геном евглени *Euglena polymorpha*.

Перший геном самостійного живого організму, який вдалося секвенувати, належить бактерії *Haemophilus influenzae* (1995). У виконанні проекту взяло участь 40 науковців з 4 дослідницьких центрів США. Далі пішла серія аналогічних робіт, наприклад, над геномами *Mycoplasma genitalum* (1995), архебактерії *Methanococcus jannaschii* (1996), бактерії *Methanobacterium thermoautotrophicum*, кишкової палички *Escherichia coli* (1997) та багато інших.

У 1996 році завершено роботу над розшифровкою генома першого еукаріотичного організму – дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Над цим



проектом працювала ціла мережа дослідних центрів і лабораторій у США, Західній Європі та Японії.

Для секвенування ДНК застосовуються методи Едмана, Сенгера та інші; у даний час для секвенування нуклеїнових кислот найбільш популярним є метод Сенгера з дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP).

Згідно методикам до початку секвенування з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) виконують ампліфікацію (збільшення числа копій) досліджуваної ділянки ДНК, послідовність якої потрібно визначити (див. нижче).

### **Метод Сенгера (ферментативний).**

Метод, розроблений Сенгером і заснований не на хімічному, а на ферментативному підході. Сенгер використовував ДНК-полімеразу I. У клітині цей фермент бере участь в процесі реплікації, заповнюючи пропуски між знову синтезованими фрагментами ДНК (фрагментами Оказакі). Для роботи ферменту в пробірці потрібні попередники ДНК – дезоксирибонуклеотидтрифосфати (dNTP), а також одноланцюгова матриця, на якій повинна бути невелика дволанцюгова ділянка, – приманка, з якої починається синтез. Також для кожної з чотирьох основ ДНК були синтезовані модифіковані дидезоксирибонуклеотиди (ddNTP), в яких дезоксирибоза 3'-ОН відсутня. ДНК-полімераза включає ці попередники в ДНК. Проте, включившись в ДНК, модифікована основа не може утворити фосфодієфірний зв'язок з наступним дезоксирибонуклеотидом. В результаті ріст (елонгація) даного ланцюга зупиняється (термінує) в тому місці, де в ДНК включився дидезоксирибонуклеотид (ddNTP). Тому їх називають термінаторами елонгації.

Реакційна суміш по Сенгеру складається з ланцюга ДНК, нуклеотидну послідовність якої треба визначити, короткого фрагмента «міченої» ДНК, комплементарної кінцевому відрізку цього ланцюга (приманка), одного з чотирьох ddNTP і відповідного dNTP в строго певному співвідношенні (щоб вони конкурували), а також останніх три dNTP. Готують чотири суміші, кожна з яких містить один з чотирьох ddNTP. У кожній з пробірок утворюється набір мічених фрагментів різної довжини. Довжина їх залежить від того, в якому місці в ланцюг включений дефектний нуклеотид. Отримані мічені фрагменти ДНК розділяють в поліакриламід-

дному гелі (з точністю до одного нуклеотида), проводять радіоавтографію і по картині розподілу фрагментів в чотирьох пробах встановлюють нуклеотидну послідовність ДНК. Довжина цих фрагментів у нуклеотидах визначить порядковий номер нуклеотиду в складі ланцюга. З метою визначення довжини фрагментів проводять гель-електрофорез. *(Принцип електрофорезу дуже простий. Суміш фрагментів ДНК (або РНК) наносять у лунку пластинки гелю – середовища, сформованого полімерною сіткою. Зазвичай гель виготовляють на основі агарози або поліакриламідю. Через нього пропускають електричний струм, завдяки чому негативно заряджені молекули нуклеїнової кислоти рухаються в електричному полі. Полімерна сітка гелю створює для цього руху суттєвий опір, якій долається тим легше, чим меншим є розмір фрагмента. Через певний час фрагменти розділяються на окремі зони – смуги гелю, які містять гомогенний набір фрагментів одного розміру. Для візуалізації смуг гель забарвлюють флуоресцентним барвником (найчастіше використовують бромистий етидій), який зв'язується з ДНК. Після цього смугу можна вирізати з гелю, та екстрагувати ДНК.)*

Після електрофорезу та візуалізації смуг із такого гелю можна прочитати нуклеотидну послідовність.

В іншому методі секвенування – методі **Максама-Гілберта** (Allan M. Maxam, Walter Gilbert) замість ферментативного синтезу застосовують хімічне розрізання ланцюга на нуклеотиди певного типу. Отримані фрагменти різної довжини так само розділяють за допомогою електрофорезу.

Метод Сенгера використовується сьогодні автоматичними секвенаторами, в яких замість радіоактивно-мічених застосовуються флуоресцентно-мічені праймери. Для кожної з чотирьох реакцій беруть чотири різні флуоресцентні мітки, котрі випромінюють світло в різних спектральних діапазонах. Продукти всіх чотирьох реакцій наносять на гель для електрофорезу разом. Сканування гелю після електрофорезу лазерним променем, що збуджує флуоресценцію, дозволяє дискримінувати продукти різних реакцій, тобто різні кінцеві нуклеотиди, і, таким чином, негайно прочитати послідовність.

Здійснення секвенування кожного із фрагментів, які містяться в геномній бібліотеці клонів, і порівняння послідовностей фрагментів, що

перекриваються, дозволяє розмістити клоновані фрагменти в порядку їхньої локалізації в геномі, тобто встановити повну послідовність геному.

Інший сучасний підхід у секвенуванні геномів (так зване піросеквенування), який реалізується на автоматизованих секвенаторах, дозволяє визначити послідовність значно швидше, дешевше і при цьому не потребує ані клонування ДНК, ані електрофорезу. Одноланцюгові фрагменти, отримані з невеликої кількості геномної ДНК, пришивають 5'-кінцями до мікрокульок (один фрагмент на кульку) та ампліфікують за допомогою ПЛР. Кожну кульку із пришитими до неї ампліфікованими ідентичними фрагментами розміщують у мікрореакторі, де здійснюється ДНК-полімеразна реакція. Нуклеозидтрифосфати подаються в реакційну суміш імпульсно один за одним. Якщо нуклеотид певного типу виявляється комплементарним матриці та включається у зростаючий ланцюг, пірофосфат, що при цьому звільняється, залучається до низки хімічних реакцій, де остання реакція супроводжується випромінюванням світла (хемілюмінесценція). Світловий сигнал фіксується оптичною системою, і послідовність таких сигналів читається як нуклеотидна послідовність. Реакція здійснюється паралельно у 200 тис. Мікрореакторів (для 200 тис. фрагментів, які перекриваються), що дозволяє встановити послідовність приблизно 200 млн пар основ за 4,5 години.

Останнім часом з'явилася нова перспектива секвенування ДНК у процесі протягування молекули через нанопору. Пóra діаметром  $\sim 1$  нм утворюється у кремнієвій мембрані, і одноланцюгова ДНК досить повільно проходить крізь цю пору під дією електричного поля. Виявилось, що характеристики електричного струму через мембрану залежать від того, який нуклеотид знаходиться в порі в даний момент. Є сподівання, що з розвитком цього методу з'явиться можливість швидкого та дешевого секвенування геному однієї конкретної людини.

В даний час визначення точної нуклеотидної послідовності будь-якого сегменту ДНК помірної довжини – цілком вирішене завдання. Вже визначена послідовність декількох сотень генів про- і еукаріот. Знаючи послідовність гена і генетичний код, легко визначити амінокислотну послідовність кодованого ним білка. Раніше для визначення структури білка доводилося робити ретельний і вельми трудомісткий аналіз ви-

діленого і очищеного білка. Зараз часто буває простіше визначити структуру білка через нуклеотидну послідовність, ніж за допомогою прямого секвенування. Якщо секвенування білка займає місяці і навіть роки, то ДНК вдається секвенувати за декілька тижнів.

Визначення послідовності ДНК призвело також до того, що були виявлені області, які не кодують білки, але беруть участь в регуляції експресії генів і реплікації ДНК. У 1996 році був секвенований геном дріжджів, в 1998 р. – геном арабідопсису, в 2000 році – геном людини, проте в даному випадку мова йде тільки про встановлення послідовності нуклеотидів, оскільки генетична структура і функції окремих ділянок генома ще не ідентифіковані, це складніше завдання.

**Метод Едмана** (англ. Edman degradation) – один з ранніх методів визначення первинної послідовності (секвенування) пептидів. Розроблений в 1950-1956 роках шведським біохіміком Пером Віктором Едманом. Суть методу полягає в обробці досліджуваного пептиду певним набором реагентів, що приводить до відщеплення однієї амінокислоти з N-кінця послідовності. Циклічне повторення реакції і аналіз продуктів реакцій дають інформацію про послідовність амінокислот в пептиді. Метод Едмана був широко поширений в другій половині ХХ століття. В даний час практично не застосовується із-за багатьох властивих йому недоліків (некількісне протікання реакції, множинні побічні процеси).

### ***2.3. Гібридизація як високочутливий метод виявлення специфічних послідовностей нуклеотидів***

При нагріванні водного розчину ДНК до 100°C і підвищенні рН до 13, ДНК дисоціює на 2 ланцюги (денатурує), оскільки комплементарні зв'язки між основами руйнуються. Цей процес обернений. Так, витримка ДНК при температурі 65°C веде до відновлення структури подвійної спіралі. Це процес ренатурації або гібридизації. Процеси гібридизації відбуваються між будь-якими одинарними ланцюгами, якщо вони комплементарні: ДНК – ДНК, РНК – РНК, ДНК – РНК.

Процес гібридизації використовують для виявлення специфічних послідовностей нуклеотидів. Для цього необхідно мати чистий однолан-

цюговий фрагмент ДНК, комплементарний тій послідовності, яку хочуть виявити. Цей фрагмент отримують або клонуванням, або шляхом хімічного синтезу. Одноланцюгова ДНК, яка використовується як індикатор, називається ДНК-зонд. Вона може містити від 15 до 1000 нуклеотидів.

ДНК-зонд застосовується в різних цілях. Гібридизація ДНК-зонда з РНК, виділеної з аналізованої клітини, може виявити наявність або відсутність експресії гена. Якщо гібридизації не відбувається, це означає, що ген не працює. ДНК-зонд також дозволяє проводити діагностику спадкових хвороб.

Одним з найбільш точних і сучасних методів аналізу є використання чіпів. Вони є пластинками з імобілізованими міченими ДНК-зондами. Кожна така пластинка може містити декілька десятків тисяч зондів, розташованих в певній послідовності. Мітка виявляється тільки в спарених дволанцюжкових фрагментах. Якщо в досліджуваному зразку є послідовності, комплементарні послідовностям зонда, то гібридизацію можна визначити візуально або за допомогою спеціальних приладів. Як правило, детектори сполучені з комп'ютером, тобто процедура прочитування і обробки інформації автоматизована.

Таку ДНК-чіп можна застосовувати для комплексної діагностики інфекційних захворювань, спадкових дефектів, встановлення експресії тих або інших генів (в цьому випадку йде гібридизація з мРНК), тобто відстежування порушень обміну речовин. Вони дешеві, дуже надійні, прості в обігу і можуть багато разів використовуватися. Недолік – дорога апаратура для детекції.

## **2.4. Методи клонування ДНК**

Існує два підходи до клонування ДНК. Перший підхід припускає використання бактерійних або дріжджових клітин для розмноження введеної в них чужорідної ДНК. Другий спосіб є ампліфікація ДНК *in vitro*. **Ампліфікація** (лат. *amplificatio* – посилення, збільшення) – збільшення числа копій ДНК. У клітині ампліфікація відбувається в результаті реплікації ДНК, в штучних умовах збільшення числа копій ДНК досягають за допомогою *полімеразної ланцюгової реакції*.



**ПЛР** – експериментальний метод, що дозволяє досягнути значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) в біологічному матеріалі (пробі).

Метод заснований на багатократному вибіркового копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ферментів в штучних умовах (*in vitro*). При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовольняє заданим умовам, і лише в тому випадку, якщо вона присутня в досліджуваному зразку. На відміну від ампліфікації ДНК в живих організмах (реплікації), за допомогою ПЛР ампліфікуються відносно короткі ділянки ДНК. У звичайному ПЛР-процесі довжина копійованої ДНК-ділянки складає не більше 3000 пар основ. За допомогою суміші різних полімераз, з використанням добавок і за певних умов довжина ПЛР-фрагмента може досягати 20-40 тисяч пар нуклеотидів.

Практично ПЛР – це реакція синтезу ДНК *in vitro*, яка повторюється багато разів: синтезовані ланцюги стають матрицями для синтезу в наступному циклі реакції. Для здійснення ПЛР треба знати принаймні короткі послідовності ДНК на кінцях того фрагмента, котрий має бути ампліфікований.

ПЛР проводять в ампліфікаторі – приладі, що забезпечує періодичне охолодження і нагрівання пробірок, зазвичай з точністю не менше 0,1 °С. Сучасні ампліфікатори дозволяють задавати складні програми, зокрема з можливістю «гарячого старту» і подальшого зберігання ампліфікованих молекул при 4 °С.

#### **Для проведення найпростішої ПЛР потрібні такі компоненти:**

- ДНК-матриця, тобто фрагмент ДНК, що містить ту ділянку, яку потрібно ампліфікувати.
- Два праймери, комплементарні кінцям необхідного фрагменту.
- Термостабільна ДНК-полімераза.
- Дезоксинуклеотидтрифосфати (А, G, С, Т).
- Буферний розчин.

Зазвичай при проведенні ПЛР виконується 20-35 циклів, кожен з яких складається з трьох стадій:

**1. Денатурація.** Дволанцюжкову ДНК-матрицю нагрівають до 94-96 °С на 0,5-2 хв., щоб ланцюги ДНК розійшлися – це процес денатурації.



**2. Відпал.** Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують до 60 °С, щоб праймери могли зв'язатися з одноланцюговою матрицею. При температурі 60 °С ланцюги ДНК не ренатурують, але праймери (оскільки вони присутні в досить високих концентраціях) знаходять свої комплементарні ділянки й зв'язуються з ними. Ця стадія називається відпалом. Температура відпалу залежить від складу праймерів і зазвичай вибирається на 4-5°С нижче за їх температуру плавлення. Час стадії – 0,5-2 хв.

**3. Елонгація.** ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюг, використовуючи праймер як приманку. Це – стадія елонгації. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини ампліфікуючого фрагмента. Середня швидкість елонгації – 1000 пар основ за 1 хв. Ця стадія триває 7-10 хв.

Після 30-го циклу кількість таких коротких матриць буде в мільйон разів більша, ніж вихідних довгих матриць.

### **Застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР):**

1. Ізоляція генетичного матеріалу. За допомогою ПЛР можна ізолювати специфічні послідовності ДНК з цілого генома.
2. Секвенування ДНК і виявлення генетичних хвороб. ПЛР дозволяє визначити послідовність нуклеотидів в ДНК, в тому числі і змінених при генетичних захворюваннях.
3. Методи рекомбінації ДНК. ПЛР часто використовується для ампліфікації гена, який потім може бути вставлений в інший геном через відповідний процес рекомбінації.
4. Використання в криміналістиці та встановлення батьківства. ПЛР використовується у методі генетичних відбитків пальців, за допомогою якого ідентифікують людину, порівнюючи її ДНК з ДНК в наданому зразку.
5. Ампліфікація та вимірювання кількості ДНК. Оскільки ПЛР ампліфікує частини ДНК, він може використовуватися для аналізу надзвичайно невеликих кількостей зразку. Крім того, кількість часу, потрібна для ампліфікації ДНК до наданого рівня, залежить від її кількості в початковому зразку, завдяки чому ПЛР може також використовуватися для визначення кількості ДНК.

6. Аналіз ДНК у зразках, що довго зберігалися. Використовуючи ПЛР, стає можливим проаналізувати ДНК, якій кілька тисяч років. Методи ПЛР були успішно використані на деяких стародавніх тваринах, наприклад мамонті віком у 40 тис. років та на людській ДНК з стародавніх гробниць, наприклад, єгипетських мумій.
7. Ідентифікація вірусної ДНК. Вірусні захворювання також можуть бути ідентифіковані за допомогою ПЛР. Використовуючи праймери, специфічні для даного вірусу, ПЛР може успішно ампліфікувати ДНК та виявити, чи присутній в ньому вірус. Оскільки ПЛР дуже чутливий, такий аналіз дозволяє виявити вірус до появи фактичних симптомів захворювання.

### ***2.5. Введення гена в клітину***

Ввести рекомбінантний ген в клітину можна 2 способами: використовуючи вектори або шляхом прямого введення.

**1 спосіб – за допомогою векторів.** Вектор – молекула нуклеїнової кислоти, частіше за все ДНК, що використовується в генетичній інженерії для передачі генетичного матеріалу іншій клітині. Відповідно вектор складається з двох компонентів: векторної частини (носія) і клонованого чужорідного гена. Завдання вектора – донести вибрану ДНК в клітину-реципієнт, вбудувати її в геном, дозволити ідентифікацію трансформованих клітин, забезпечити стабільну експресію введеного гена.

Таким чином, вектор повинен бути невеликим, здатним підтримуватися в клітині-господарі (реплікуватись), багато разів копіюватися (ампліфікувати), експресувати відповідний ген (містити відповідні регуляторні послідовності), мати маркерний ген, що дозволяє розрізняти гібридні клітини для ефективною їх селекції, здатним передаватися в клітину відповідного організму.

#### ***Типи векторів для введення гена в клітину.***

Існує декілька типів векторів:

- **Бактерійні плазміди**

Основна маса клітинної ДНК бактерій міститься в хромосомі. Проте окрім хромосом бактерії містять велику кількість дуже маленьких кіль-

цевих молекул ДНК плазмід завдовжки декілька тисяч пар основ. Такі міні-хромосоми називають **плазмідами**.

Як правило, плазміди мають в своєму складі гени стійкості до антибіотиків, іонів важких металів (R-плазміди), а також гени, що контролюють катаболізм деяких органічних сполук (плазміди біодеградації, або D-плазміди). Оскільки ці гени знаходяться в плазмідах, вони представлені набагато більшим числом копій.

Плазміди виділяють з різних штамів і видів бактерій.

Оскільки плазмідна ДНК значно менша хромосомної, її досить легко виділити в чистому вигляді. У присутності іонів кальцію плазміди легко поглинаються бактеріями-рецепієнтами, навіть якщо ті їх ніколи не містили, і в клітинах бактерійного потомства можна виявити багато копій поглиненої плазміди.

- **Віруси**

Є віруси, які не ведуть до загибелі клітини, але вбудовуються в геном клітини-господаря і розмножуються разом з нею, або викликають її неконтрольований ріст, тобто перетворюють на ракову. До таких відносяться ДНК-віруси SV-40 (поліомавірус). Для бактерійних клітин як вектор часто використовують бактеріофаги.

Віруси є одними з головних кандидатів на роль векторів для введення чужорідної ДНК. При вірусній інфекції кожна клітина може отримати велике число копій чужорідного гена. ДНК можна вбудовувати так, щоб вона знаходилася під контролем сильних вірусних промоторів, що забезпечить високий рівень експресії гена, і його продукти будуть доступніші для дослідження.

Вірус повинен бути життєздатним після рекомбінування його ДНК. Найлегше віруси вводяться в бактерії. Недоліком вірусів як векторів є їх невелика ємкість. Крім того, віруси інфікують невелике коло господарів.

Існують гібридні вектори, такі, що містять ДНК фага і плазміди. До них відносяться, наприклад, **косміди і фазміди**.

- **Косміди** – плазмідні вектори, в яких вбудована ділянка генома фага, що забезпечує можливість упаковки цієї молекули ДНК у фагову частинку. Фагові частинки забезпечують хороше проникнення гібридної

ДНК в клітину (шляхом ін'єкції), після чого відбувається замикання ДНК в кільце по липких кінцях і реплікація її за плазмідним типом.

- **Фазміди** також є гібридами між фагом і плазмідною. Після вбудовування чужорідної ДНК можуть в одних умовах розвиватися як фаги, в інших – як плазміди.
- **Плазміди агробактерій**

Як вектори можуть використовуватися пухлиноподібні плазміди бактерій. Види *Agrobacterium* еволюційно споріднені бульбочковим бактеріям, що відносяться до роду *Rhizobium*, і мають багато загальних з ними рис. Проте характер взаємодії агробактерій з рослиною має своєрідні особливості.

Взаємодія видів *Agrobacterium* з рослинами представляє особливий інтерес, оскільки при цьому виді паразитизму один з партнерів специфічно видозмінює властивості господаря, вбудовувавши свої гени в його геном. Крім того, це служить унікальним прикладом міграції ДНК прокариот в еукаріотичну клітину.

Завдяки здатності *Agrobacterium tumefaciens* трансформувати клітини рослин, ця бактерія зараз активно використовується для перенесення генетичного матеріалу з метою генетичної модифікації рослин.

- **ДНК мітохондрій і хлоропластів**

Хлоропласти і мітохондрії містять повноцінну генетичну систему, тобто всі компоненти, необхідні для експресії генетичної інформації: ДНК, ДНК-полімерази, РНК-полімерази і білоксинтезуючий апарат (рибосоми, т-РНК, аміноацил-тРНК-синтетази). Хлоропластна і мітохондріальна ДНК також привертають увагу учених як можливі вектори для перенесення генів в клітину.

## **2 спосіб – пряме введення генів в клітину.**

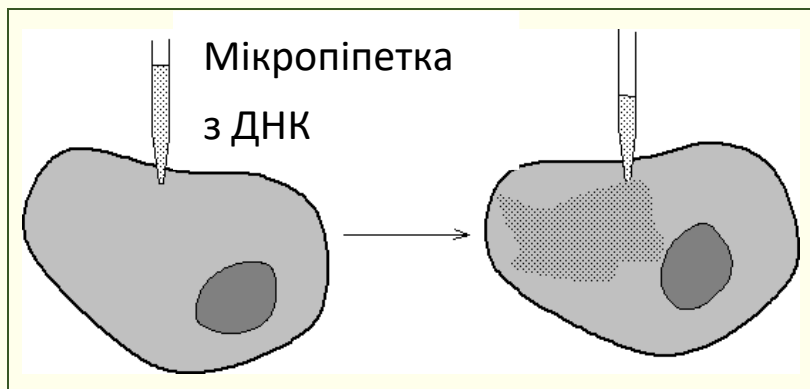
Пряме введення гена в клітину здійснюють декількома способами:

- Трансфекція.
- Мікроін'єкція.
- Електропорація.
- Метод «міні-клітин».

- Упаковка в ліпосоми.
- Електронна гармата.

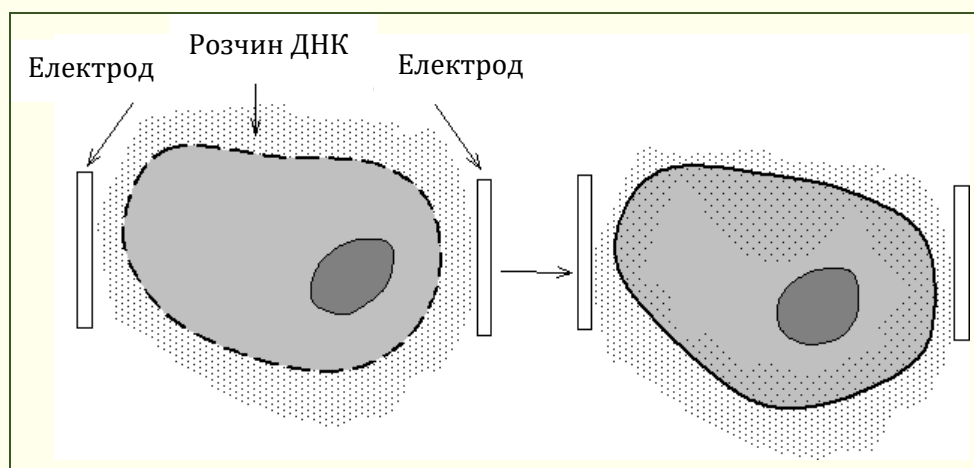
При **трансфекції** ДНК адсорбується на кристалах фосфату кальцію (Грехем Ван дер Еб, 1973). Утворюються частинки кальцієвого преципітату (осаду). Вони поглинаються клітиною шляхом фагоцитозу.

**Мікроін'єкція** ДНК в клітини ссавців стала можливою з появою приладу для виготовлення мікропіпеток діаметром 0,1-0,5 мікрона і мікроманіпулятора (рис. 7). Метод введення ДНК за допомогою мікроін'єкцій був розроблений на початку 70-х років Андерсоном і Діакумаком. За 1 годину можна ін'єкувати 500-1000 клітин. Перевага описуваного методу полягає також в тому, що він дозволяє вводити будь-яку ДНК в будь-які клітини, і для збереження в клітинах введеного гена не потрібний ніякий селективний тиск.



*Рис. 7. Введення ДНК шляхом мікроін'єкції*

**Електропорація** заснована на тому, що імпульси високої напруги зворотно збільшують проникність біомембран. В середовище для електропорації додають клітини і фрагменти ДНК, яку необхідно ввести в клітини. Через середовище пропускають високовольтні імпульси, що призводять до утворення пор в мембрані цитоплазми, час існування і розмір яких достатні, щоб такі макромолекули, як ДНК, могли із зовнішнього середовища увійти до клітини в результаті дії осмотичних сил. При цьому об'єм клітини збільшується.



**Рис. 8.** Метод електропорації

«Міні-клітини» отримують шляхом блокування донорних клітин мітозу *колцемідом*. При тривалій обробці клітин *колцемідом* в них навколо кожної хромосоми формується нова ядерна мембрана. Обробка *цитохалазином В* і центрифугування призводить до утворення міні-клітин, що представляють мікроядра, інкапсульовані в мембрану цитоплазми.

Отримані міні-клітини дуже чутливі до різного роду дій, тому для злиття підбирають спеціальні умови. Метод важкий і ефективність його низька.

**Упаковка в ліпосоми** використовується для захисту екзогенного генетичного матеріалу від руйнуючої дії рестриктаз.

Ліпосоми – сферичні оболонки, що складаються з фосфоліпідів. Отримують їх шляхом різкого струшування суміші водного розчину і ліпідів, або обробляючи ультразвуком водні емульсії фосфоліпідів. Системи перенесення за допомогою ліпосом низькотоксичні по відношенню до клітин.

**Метод електронної гармати** є одним з найефективніших на сьогоднішній день методів трансформації рослин, особливо однодольних.

Суть методу полягає в тому, що на найдрібніші частинки вольфраму, золота, силікону, напильюється ДНК вектор, що містить необхідну для трансформації генну конструкцію. Мікрочастинки, що несуть ДНК, наносяться на целофанову підкладку і поміщаються всередину біолістичної гармати. Калус або суспензія клітин наноситься в чашку Петрі з агаризованим середовищем і поміщається під біолістичну гармату на відстані



10-15 см. У гарматі вакуумним насосом зменшується тиск до 0,1 атм. У момент скидання тиску мікрочастинки з величезною швидкістю викидаються з біолістичної гармати і, розриваючи клітинні стінки, входять в цитоплазму і ядро клітин.

Зазвичай клітини, розташовані безпосередньо по центру, гинуть через величезну кількість і тиск мікрочастинок, тоді як в зоні 0,6-1 см від центру знаходяться найбільш вдало протрансформовані клітини. Далі клітини обережно переносять на середовище для подальшого культивування і регенерації.

### **3. ТРАНСГЕННІ РОСЛИНИ І ТВАРИНИ. ПЕРСПЕКТИВИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ**

#### ***3.1. Области застосування генної інженерії рослин***

##### **1. Метаболічна інженерія.**

У рослин вона спрямована на проведення трансгенною клітиною нових біохімічних реакцій шляхом введення чужорідних генів або модифікацією генів клітини-господаря. Рослини – один з найбільш привабливих об'єктів для метаболічної інженерії. Маючи однакові шляхи синтезу основних біологічних сполук, рослини відрізняються вражаючою різноманітністю своїх кінцевих продуктів: *цукрами, ароматичними сполуками, жирними кислотами, стероїдними сполуками та іншими біологічно активними речовинами*. Багато з цих сполук представляють велику цінність для фармакології.

Іноді такими продуцентами важливих лікарських речовин є унікальні тропічні та ендемічні рослини, недоступні для їх вирощування в помірних кліматичних зонах більшості розвинених країн світу. Виділення з таких рослин генів, що визначають спрямований синтез специфічних органічних сполук, і їх перенесення в підібрані відповідні рослини перетворюють їх на нові продуценти важливих біологічно активних речовин.

Прикладом метаболічної інженерії є одержання нових рослин-продуцентів **резвератролу**, цінного лікарського препарату широкого

спектру дії, що уповільнює старіння. **Резвератрол** – фітоалексин – антибактеріальна та протигрибкова речовина, що виробляється рослинами у відповідь на інфекцію патогенів. Був виявлений у винограді.

## **2. Створення рослин з поліпшеними лікувально-дієтичними властивостями.**

Це допоможе поліпшити харчову цінність рослин.

Наприклад, нещодавно отримані трансгенні рослини суниці з підвищеним синтезом **аскорбінової кислоти**. Створені рослини сої з підвищеним в п'ять разів вмістом **вітаміну Е** в насінні. Вже існує салат зі збільшеним вмістом **заліза**, збагачена **лізином** кукурудза.

## **3. Створення рослин, стійких до гербіцидів.**

Найпоширенішими є трансгенні рослини, стійкі до **гліфосату (Раундап)** – найпопулярнішого гербіциду, що розкладається в ґрунті на нетоксичні складові і тому безпечного для навколишнього середовища. Ген був виділений з гліфосат-стійкого штаму *E. coli*.

## **4. Виведення рослин, стійких до шкідників і хвороб.**

Перші стійкі до шкідників рослини, створені за допомогою методів генної інженерії, були введені в культуру в 90-х роках минуло сторіччя. Ці генетично модифіковані рослини (Bt-культури) несуть гени грампозитивної аеробної спороутворюючої бактерії *Bacillus thuringiensis*, яка синтезує параспоральні (локалізовані поруч зі спорою) кристалічні утворення, що містять d-ендотоксин – Cry-білки, що вбивають личинок комах різних порядків.

Одними з перших в широку практику увійшли інсектицидні **бавовна і кукурудза**. Cry-білок є протоксином, який розщеплюється в кишечнику личинок комах, утворюючи активований токсин. Активований токсин, в свою чергу, специфічно зв'язується з рецепторами в середній кишці комах, що призводить до лізису клітин кишкового епітелію. Даний ентомотоксин – смертельна отрута для ряду комах (в тому числі і колорадського жука), але в той же час цілком безпечний для людини і тварин, оскільки в організмі ссавців немає ферментів для його розщеплення і засвоєння. Введення гена протоксину в рослини призвело до того, що **Bt-рослини**

перестали поїдатися комахами. Цим шляхом було отримано трансгенну картоплю, стійку до колорадського жука.

## 5. Виведення стійких до вірусів рослин.

Стійкість до вірусів є важливим для підвищення сільськогосподарської продуктивності. В даний час в різних країнах світу проводять польові випробування стійких до вірусів сортів батату, кукурудзи та африканської маніоки. Можливо, ці культури будуть комерціалізовані протягом найближчих 3-5 років. Розроблено стійкий до нематод (круглі черви) сорт ГМ-картоплі.

## 6. Фармакологія.

Рослини є зручною, безпечною та економічно вигідною альтернативою для отримання різних білків, вакцин і антитіл у порівнянні з системами експресії на основі мікроорганізмів, культур клітин тварин або трансгенних тварин.

За останні 20 років безліч цінних білків ефективно експресовано в рослинах. Це білки людської сироватки, регулятори росту, антитіла, вакцини, промислові ферменти, біополімери тощо. Перспективне отримання ГМ-рослин, що синтезують нові форми антимікробних пептидів.

Деякі білки, що синтезуються трансгенними рослинами, вже виробляються західними компаніями або будуть випущені на ринок у найближчі роки. Наприклад, **трипсин** (*травний фермент, що розщеплює білки*) та  **$\beta$ -глюкуронідаза** (*фермент, що розщеплює глюкуронід з утворенням глюкуронової кислоти і спирту*), що виділяються з трансгенної кукурудзи, виробляються фірмою *Sigma-Aldrich* (США). Незабаром повинні будуть підготовлені до промислового виробництва **колаген** (*білок сполучної тканини*), **ліпаза** (*фермент, що розщеплює жири*), **лактоферин** (*білок, що міститься в грудному молоці та інших рідинах організму і є одним з компонентів імунної системи*), **лізоцим** (*фермент, що руйнує клітинну оболонку бактерій, міститься в слині, сльозах*), синтезовані трансгенними рослинами.

## 7. Синтез вакцин в трансгенних рослинах.

В даний час більше 50 різних антигенів були експресовані в ГМ-рослинах. Для деяких з них показана імуногенність при оральному введенні.

ні. Інтенсивно розробляється концепція «їстівних вакцин» на основі трансгенних рослин, чії плоди, листя і насіння годяться в їжу, з вбудованим відповідним фрагментом геному патогенного мікроорганізму, який викликає в організмі людини чи тварини утворення антитіл, що формують імунітет. З урахуванням необхідності використання цих вакцинних продуктів у сиromу вигляді, досліджується вирощування вакцин на рослинах, які не потребують кулінарної обробки перед вживанням: бананах, томатах, салаті.

У разі успіху зникне потреба у вартісному очищенні антигенів, яка необхідна при створенні вакцин для парентерального введення (спосіб введення в організм лікарських та інших речовин, минаючи шлунково-кишковий тракт, наприклад, підшкірне упорскування, внутрішньовенне вливання та ін.). Антигени, які експресуються в рослинах, захищені рослинними клітинними стінками від протеолізу при проходженні травним трактом і можуть бути легко доставлені до клітин слизової оболонки кишечника, що відповідають за імунні відповіді організму.

Перша така вакцина була одержана у 1992 році: трансгенна рослина табаку стала продукувати «австралійський» антиген. Одержаний з рослин та частково очищений антиген, введений мишам, викликав імунну відповідь подібно до вакцини проти гепатиту В. У 1998 році за допомогою картоплі, що продукує В-субодиницю холерного анатоксину, було одержано виражений захист у мишей, до раціону яких входила трансгенна картопля, при зараженні їх холерою. Аналогічна вакцина проти кору була одержана на табаку. Перший клінічний досвід з випробування харчових вакцин на людині відбувся в 1997 році, коли добровольці їли генетично змінену сирю картоплю з протидіарейними генами. Десять з одинадцяти добровольців, які отримали по 100 грамів сирої картоплі, що продукує антигени ентеропатогенної кишкової палички, мали вчетверо підвищений рівень антитіл до цього збудника, які почали вироблятися у слизовій оболонці кишечника. Випробовуються «картопляні» вакцини до вірусу Ньюарк (збудника діареї) та гепатиту В. На тваринах досліджуються вакцини проти сказу, вирощені на томатах.

### ***3.2. Комерціалізація трансгенних рослин і біобезпека***

З моменту публікації в 1983 р. перших робіт з отримання трансгенних рослин тютюну кількість існуючих зараз трансгенних рослин уже не піддається обліку. В даний час в сільськогосподарському виробництві загальні площі біотехнологічних культур досягли вже 114 300 000 га. Крім того, сотні сортів десятків видів харчових і технічних рослин з найрізноманітнішими новими властивостями чекають дозволу на комерційне використання.

Найпоширенішими з трансгенних сільськогосподарських рослин є **soя (51%), далі кукурудза (31%), бавовна (13%) і ріпак (5%).**

Необхідно відзначити, що деякі генно-модифіковані культури (наприклад, ГМ-soя) вже обігнали по захопленій площі свої «традиційні» аналоги.

Починає збільшуватися частка культивованих трансгенних рослин, стійких до вірусів, грибків, нематод та інших шкідників, холоду, спеки, засухи або тих, що довго не псуються при зберіганні.

Нові сорти здатні рости там, де старі просто не могли вижити. Наприклад, Північна Дакота, що раніше вважалася не придатною для вирощування соєвих бобів, в даний час вже стала одним з головних постачальників цієї культури в США.

Широке поширення сільськогосподарських трансгенних рослин пояснюється тим, що їх культивування дозволило фермерам різко підвищити врожаї, при цьому знизити закупівлі гербіцидів та закупівлі інсектицидів. Наприклад, проведені в Індії і Китаї в 2007 р. дослідження показали, що використання Vt-бавовни дало можливість збільшити врожайність до 50 і 10% відповідно і скоротити використання інсектицидів в обох країнах до 50% і більше.

Трансгенні посадки продовжують розростатися по всьому світу. У середньому за рік вони збільшуються на 10-15%. Безсумнівним лідером в культивуванні трансгенних рослин, як і раніше залишаються США.

Генно-інженерні сільськогосподарські культури дозволять вирішити продовольчу проблему. Так, чисельність населення планети станом на 2011 рік становить 7 млрд, в рік збільшуючись приблизно на 80 млн. За прогнозами ООН, до 2020 р. населення Землі зросте з нинішніх до 7,5 млрд чол., а до 2050 року перевищить 9,5 млрд чол. Вже сьогодні бли-

зько 800 млн чол. у світі голодують. В подальшому ця проблема лише загостриться, оскільки збільшення виробництва продуктів харчування стало відставати від приросту населення. Зростання споживання ГМ-продуктів вважається одним із способів боротьби з голодом.

Сьогодні в багатьох країнах світу практично неможливо уникнути вживання генетично модифікованих рослин. Так, з великою часткою ймовірності можна сказати, що практично всі продукти, вироблені з використанням кукурудзяного, соєвого або бавовняного масла, містять генетично змінений матеріал.

**Біобезпека трансгенних рослин** залишається предметом гострих дискусій у суспільстві.

Існує думка, що трансгенні рослини здатні негативно впливати на навколишнє середовище.

**По-перше**, існує побоювання, що стійкі до гербіцидів культурні рослини можуть при міжвидовому запиленні передавати ці гени близькородним бур'янам, які можуть перетворитися на незламні супер-бур'яни (superweeds). Хоча вірогідність такого небажаного розвитку подій для більшості сільськогосподарських культур дуже мала, генні інженери активно розробляють підходи для виключення подібної небезпеки. Наприклад, пробують вводити в рослини не один, а відразу декілька генів стійкості до різних гербіцидів. Передача декількох генів бур'янам набагато менш вірогідна, ніж одного гена. Пропонується також вводити гени стійкості не в ядерний, а в хлоропластний геном. Це може запобігти небажаному дрейфу генів за допомогою пилку, оскільки ДНК хлоропластів успадковується тільки по материнській лінії.

**По-друге**, вважають, що трансгенні рослини з вбудованими «інсектицидними» генами, здатні спровокувати у комах-шкідників виникнення масової резистентності. Тут також запропоновані дієві способи для зменшення цієї небезпеки, наприклад, використання генів декількох різних токсинів і/або індукцйбельних промоторів, що швидко активуються при нападі комах на рослину.

**По-третє**, вважають, що пилки трансгенних рослин може бути токсичним і для корисних комах, які даним пилом харчуються. Деякі експериментальні дані говорять про те, що така небезпека дійсно існує, хоча про її можливі масштаби говорити поки важко. Проте і тут вже за-



пропоновані і випробувані адекватні генно-інженерні рішення, наприклад, використання трансгенозу через хлоропластну ДНК, або промоторів, що не працюють в пилку.

### **3.3. Трансгенні тварини: технології одержання**

На відміну від рослин, де існує можливість отримання цілої фертильної рослини з однієї трансформованої соматичної клітини, одержання трансгенних тварин – дуже складний і тривалий процес.

**Стратегія, що використовується при цьому полягає в наступному:**

1. Клонований ген вводять в ядро заплідненої яйцеклітини.
2. Запліднені яйцеклітини з екзогенної ДНК імплантують в реципієнтну жіночу особину (оскільки успішне завершення розвитку ембріона ссавців в інших умовах неможливо).
3. Відбирають нащадків, які розвинулися з імплантованих яйцеклітин, що містять клонований ген у всіх клітинах.
4. Схрещують тварин, які несуть клонований ген в клітинах зародкової лінії і отримують нову генетичну лінію.

Експерименти по генетичній модифікації багатоклітинних організмів шляхом введення в них трансгенів вимагають багато часу. Тим не менш, трансгеноз став потужним інструментом для дослідження молекулярних основ експресії генів ссавців і їх розвитку, для створення модельних систем, що дозволяють вивчати хвороби людини, а також для генетичної модифікації клітин молочних залоз тварин з метою отримання з молоком важливих для медицини білків. Був навіть запропоновано новий термін «**фармінг**» (*pharming*), що відноситься до процесу отримання з молока трансгенних домашніх тварин білків людини або фармацевтичних препаратів. Використання молока доцільно тому, що воно утворюється в організмі тварини у великій кількості і його можна надоювати у міру потреби без шкоди для тварини.

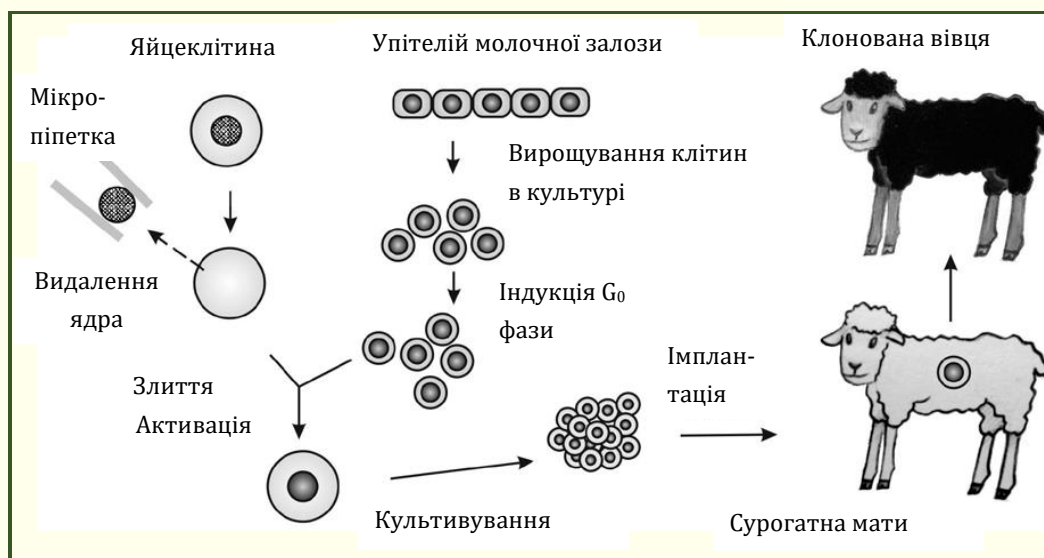
Незважаючи на те, що перші трансгенні сільськогосподарські тварини були отримані в 1985 р. введенням екзогенної ДНК в пронуклеус зигот, до теперішнього часу не розроблено ефективного методу, який би міг бути використаний для створення генетично модифікованих тварин незалежно

від виду та від цілей експерименту. Розробка нових ефективних методів переносу генів у ембріональні і соматичні клітини тварин, а також вдосконалення існуючих підходів залишається актуальним завданням.

Знаменита овечка Доллі була клонована у 1997 р. шляхом перенесення ядер трансформованих генеративних і соматичних клітин в яйцеклітину (соматичне ядерне перенесення). Це досягли шляхом злиття культивованих клітин епітелію молочної залози (вимені) дорослої шестирічної тварини з позбавленою ядра яйцеклітиною.

Основна проблема, яку потрібно вирішити для того, щоб створення будь-яких трансгенних тварин за допомогою методу переносу ядер стало реальним – це збереження плюрипотентності клітин в безперервній культурі. В даний час ведуться активні пошуки факторів репрограмування диференційованих клітин для індукції плюрипотентності.

Незважаючи на розроблений широкий спектр методик одержання трансгенних тварин, у даний час поки відсутня надійна і ефективна технологія трансгенезу тварин. Найбільші проблеми пов'язані з безладним вбудовуванням екзогенної ДНК в геном при використанні більшості існуючих методів.



**Рис. 9.** Клонування вівці методом перенесення ядра. Епітеліальні клітини молочної залози в культурі індукують для переходу у фазу  $G_0$  (стадія, на якій знаходиться яйцеклітина). Потім здійснюють злиття такої клітини з енукейованою яйцеклітиною (без ядра) і вирощують ембріони до ранніх стадій ембріогенезу. Після цього ембріони імплантують в матку сурогатної матері, де відбувається подальший розвиток. В експерименті Я. Уілмут (I. Wilmut) з клонування Доллі було проведено 277 злиттів без'ядерних яйцеклітин з клітинами молочної залози у фазі  $G_0$ , з 29 ембріонів, що вижили тільки один розвинувся до життєздатного організму

### ***3.4. Застосування трансгенних тварин***

Застосування трансгенних тварин можна розділити на п'ять основних категорій:

- наукові моделі;
- моделі для вивчення хвороб людини;
- джерела для виробництва фармацевтичних препаратів;
- джерела ксенотрансплантатів;
- джерела їжі.

Більшість з областей комерційного застосування трансгенних тварин в даний час знаходяться на ранніх етапах досліджень і розробки, за деякими винятками.

Важливою віхою в історії застосування трансгенних тварин став 2006 р., коли Європейське медичне агентство видало перший дозвіл на комерційне використання першого рекомбінантного білка з молока трансгенних тварин. Ним став рекомбінантний **антитромбін III** (з комерційною назвою АТгун), який призначений для профілактичного лікування пацієнтів з вродженою антитромбіновою недостатністю.

#### **Наукові моделі.**

Трансгенна технологія несе в собі великі можливості, в першу чергу, для фундаментальних досліджень принципів функціонування геномів і окремих генів. Регульовані системи експресії трансгенів дають можливість досліджувати тонкі механізми впливу продуктів того чи іншого гена на фізіологію і ембріональний розвиток тварин.

#### **Моделльні системи для вивчення хвороб людини.**

Використовуючи цілих тварин, можна моделювати виникнення патології, досліджувати її розвиток і способи лікування. І хоча дані, отримані на трансгенних моделях, не завжди можна екстраполювати на людину в медичних аспектах, вони дозволяють виявити ключові моменти етіології складної хвороби, її молекулярні основи і підказати шляхи лікування.

В даний час на мишах змодельовані такі захворювання людини, як СНІД, хвороба Альцгеймера, артрит, м'язова дистрофія, гіпертонія, утворення пухлин, нейродегенеративні порушення, дисфункція ендокринної

системи, серцево-судинні захворювання та багато інших. Отримана дрозофіла з хворобою Паркінсона.

### **Джерела для виробництва фармацевтичних білків.**

Існуючі методи отримання в культурах клітин рекомбінантних людських протеїнів для медичних цілей мають ряд істотних недоліків і жорстких законодавчих обмежень. Однією з особливостей таких медичних препаратів є їх украй висока ціна, обумовлена в тому числі високою вартістю клітинного культивування. Долаючи ці обмеження, велика кількість білків можна отримувати з молока трансгенних тварин, що несуть людські гени, відповідальні за вироблення певного протеїну, під контролем промоторів, специфічних для молочних залоз. В даний час численні білки отримані в великих кількостях ефективною секрецією в молоко трансгенних мишей, кроликів, овець, свиней, кіз і корів. Першим препаратом з молока став **АТгуп (людський антитромбін III)**, призначений для профілактичного лікування пацієнтів з вродженою антитромбіновою недостатністю), який в 2006 р. після 3-ї фази клінічних випробувань був зареєстрований як ліки в Європейському союзі. Успішна реєстрація препарату **АТгуп** продемонструвала правильність такого підходу до продукції терапевтичних білків і полегшила шлях на ринок іншим рекомбінантним препаратам з молока трансгенних тварин, а також стимулювала наукову і комерційну активність в даній області.

Іншим джерелом продукції рекомбінантних білків є кров трансгенних тварин. Отримані трансгенні бички, які продукують біспецифічні антитіла людини в своїй крові. Ці антитіла після очищення з сироватки були дуже стабільні і відповідним чином стимулювали Т-клітинне знищення ракових клітин.

Отримання трансгенних курчат відкрило можливість використовувати яйця, що містять чимало запасних білків для накопичення потрібних рекомбінантних білків – активних компонентів лікарських засобів. У цьому випадку білки можна отримувати у великих кількостях, і їх виробництво буде дешевим, так як сировиною для цього є всього лише пташиний корм. На сьогодні вже отримано дозвіл на клінічні випробування препарату проти раку на основі курячих яєць.

## **Трансгенні тварини як джерела ксенотрансплантатів для людини.**

Дефіцит людських органів для трансплантації змушує вчених шукати інші альтернативні джерела тканин. Так, станом на 2006 р. у США 80 тис. чол. потребували пересадки органів.

Вирішенням цієї проблеми могла б бути пересадка людині органів тварин. Так, наприклад, органи свині підходять людині за своєю будовою, розміром і багатьма біохімічним показникам, але такі пересадки неможливі, оскільки ці органи будуть негайно відторгнуті імунною системою пацієнта. В даний час ряд дослідницьких центрів працюють над виведенням генетично модифікованих свиней, органи яких можуть бути використані для трансплантації.

Необхідними умовами для успішної ксенотрансплантації є:

- 1) подолання імунологічних бар'єрів (гістосумісності);
- 2) недопущення переносу патогенів від донорної тварини людині;
- 3) анатомічна і фізіологічна сумісність донорного органу з людським.

За допомогою соматичного ядерного переносу отримані тварини, у яких супресований поки перший імунологічний бар'єр – **реакція відторгнення негайного типу (гіперактивне відторгнення)**. Перші експерименти по пересадці свинячих трансгенних нирок і серця *нелюдиноподібним приматам (навіани)* з імунною супресією показали відсутність реакції відторгнення негайного типу, але виживаність пересаджених органів становила всього 2-6 місяців.

Роботи по отриманню свиней-ксенотрансплантерів з множинними трансгенами, критичними для подолання інших імунологічних бар'єрів, тривають. Однак, незважаючи на багаторічні дослідження, пересадка людині органів свині все ще є віддаленим проектом.

## **Трансгенні тварини, як джерело їжі.**

Ці тварини ще дуже далекі від комерційного використання, хоча створено вже багато різних варіантів. Наприклад, в геном свиней вдалося вбудувати декілька прискорюючих ріст генів, які також впливають на якість м'яса, роблячи його більш пісним і ніжним. Ця робота розпочата більше 10 років тому, проте в силу певних негативних морфологічних і фізіологічних змін, що спостерігалися у тварин, цей варіант не був комерціалізований.

Запропоновано також велику кількість модифікацій молока великої рогатої худоби, що полягають у додаванні нових білків або в маніпуляціях над ендогенними протеїнами. Наприклад, були створені тварини, які продукують молоко для дитячого харчування, за своїм складом максимально наближене до материнського молока людини.

Учені з Нової Зеландії отримали корів з підвищеним вмістом в молоці казеїну. Використання такого молока повинно підвищити продуктивність сироваріння виробництва.

Ще кілька груп дослідників працюють над зниженням вмісту в молоці лактози. Кінцевою метою є створення молока, придатного для вживання в їжу людьми з лактозною непереносимістю.

Поки ближче всіх на шляху до комерціалізації знаходяться **фітазні трансгенні свині** (екосвині), метою створення яких було різке зменшення гнойового забруднення навколишнього середовища. Ця лінія несе ген бактеріальної фітази, яка дозволяє свиням розщеплювати рослинні фітати (інозитолгексафосфат – найбільш поширену нерозчинну форму органічного фосфору ґрунту), що зменшує вихід забруднюючих навколишнє середовище фекальних токсичних сполук фосфору (до 75%).

З підвищенням потреби в рибопродуктах ГМ-риба може набути велике значення як продукт харчування. Найбільш ймовірно, що першою ГМ-твариною на продовольчому ринку стане швидкоростуча сьомга (*Salmo salar*), в геном якої вбудований ген гормону росту чавичі (*Oncorhynchus tshawytscha*). Така сьомга росте в 3-4 рази швидше нетрансгенних аналогів, що значно зменшує час вирощування.

Ген гормону росту також вбудували в геноми таких риб, як білий амур, райдужна форель, тіляпія і сом. У всіх випадках трансгени виділяли з геномів риб інших видів.

**Трансгенні домашні улюбленці.** Поки що найуспішнішим випадком комерціалізації трансгенних тварин можна вважати декоративних рибок. Трансгенна акваріумна рисова рибка *Oryzias latipes*, яскраве зелене забарвлення якої обумовлено вбудованим геном зеленого флуоресцентного білка з медуз, просувається на ринок тайванською компанією Taikong.



Під торговою маркою GloFish в США продаються різнокольорові риби-зебри *Danio rerio*, зафарбовані флуоресцентними білками коралів. При відповідному освітленні червоні, зелені і жовті риби починають яскраво світитися, хоча природне забарвлення *D. rerio* сірого кольору.

У Європі, Канаді і Австралії трансгенні риби заборонені, мабуть, внаслідок загальних попереджень проти трансгенних тварин.

## 4. ГЕНОТЕРАПІЯ

Лікування захворювань за допомогою генів отримало назву **генотерапії**. Це вид лікування, який передбачає зміну або заміну генів у клітинах людини для лікування або запобігання захворюванням. Генотерапія передбачає додавання нових функціонуючих генів у клітини, які були відсутні або несправні, або шляхом інактивації чи відновлення наявних генів.

Гени можуть бути доставлені до клітин різними способами, включаючи вірусні вектори (трансдукція), які є спеціальними вірусами, що були модифіковані для перенесення нового гена в клітини, і невірусні методи (трансфекція), такі як електропорація чи пряме введення ДНК.

Редагування генів є перспективним підходом до зміни геному людини для лікування генетичних хвороб, серцево-судинних патологій, вірусних захворювань, онкологічних патологій та хвороб асоційованих з віком. Активно досліджується генотерапія неврологічних хвороб, когнітивних дисфункцій та наслідків травм нервової системи, а також в регенеративній медицині.

Практично в будь-якій області медицини або початі клінічні випробування лікування спадкових захворювань за допомогою генотерапії, або в досліджах на тваринах розробляються підходи до такого лікування. У міру удосконалення методів доставки генів і контролю їх експресії список захворювань, до яких можна застосовувати генотерапію, безумовно розширюватиметься.

Історично генна терапія націлювалась на лікування спадкових генетичних захворювань, проте поле її застосування, принаймні теоретично, розширилося. В наш час генну терапію розглядають як потенційно уні-

версальний підхід до лікування широкого спектра захворювань, починаючи від спадкових, генетичних і закінчуючи інфекційними.

Величезні перспективи відкриває використання генотерапії для лікування онкологічних захворювань. Багаторічні зусилля учених привели до розуміння того, що рак – це генетичне захворювання і його розвиток відбувається багатостадійно, в результаті серії генетичних порушень, що накопичуються в клітині.

Методи генної терапії дозволяють лікувати різні генетичні патології в період внутрішньоутробного розвитку.

Генна терапія успішно застосовується для лікування мультифакторіальних хвороб (діабет, остеопороз, ревматоїдний артрит). Для лікування таких захворювань застосовується не одна, а відразу багато генетичних конструкцій, що виправляють дефекти різних стадій перебігу патологічного процесу.

### **Історія розвитку генотерапії.**

Одним із найперших успішних прикладів було використання генної терапії для лікування важкого комбінованого імунodefіциту (ВКІД), рідкісного та часто смертельного генетичного розладу, який впливає на імунну систему. У 1990 році група дослідників з Національного інституту здоров'я провела перше успішне випробування генної терапії ВКІД, під час якого вони використовували генетично модифікований вірус для доставки здорових копій гена, якого не було у пацієнтів із ВКІД, до клітин кісткового мозку. Ця генна терапія призвела до вироблення функціональних імунних клітин у пацієнтів, що призвело до значного покращення їхніх симптомів і нормалізації функції їхньої імунної системи.

- Перша комерційна генна терапія, *Gendicine*, була схвалена в Китаї у **2003** році для лікування деяких видів раку. *Gendicine* – це препарат для генної терапії, який використовується для лікування пацієнтів із плоскоклітинним раком голови та шиї, пов'язаним із мутаціями в гені *TP53*.
- У **2006** році була перша демонстрація ефективної боротьби з раком з використанням генної терапії. Вчені з *National Institutes of Health* (Меріленд) успішно поборолі метастазуючу меланому у двох пацієнтів, використовуючи генетично змінені Т-кілери. Колектив вчених на чолі з Luigi Naldini і Brian Brown з Міланського *San Raffaele Telethon Institute*

*for Gene Therapy* (HSR-TIGET) повідомив про прорив в генотерапії: розроблений спосіб «обману» імунної системи, що викликає відторгнення генно-модифікованих клітин. Для цього специфічним чином використовується мікроРНК (некодуючі РНК). Відкриття може зіграти ключову роль в розробці методів генної терапії гемофілії.

- У травні **2007** року *Moorfields Eye Hospital* і *University College London's Institute of Ophthalmology* оголосили про перше випробування генотерапії для лікування вродженого амаврозу Лебера (*спадкове захворювання сітківки*). Перша операція була виконана на 23-річному британці Роберту Джонсону на початку 2007 року. Лікування призвело до позитивних результатів, при цьому не було виявлено ніяких побічних ефектів.
- У грудні **2008** року успішно завершилися випробування на мишах терапії серпоподібно-клітинної анемії.
- У **2009** році генотерапія успішно була застосована для поліпшення стану хворих на ВІЛ і ВКІД (важкий комбінований імунодефіцит). На гризунах показана ефективність генотерапії в терапії хронічного болю та деяких видів глухоти і сліпоти.
- У **2010** році опубліковано статтю, в якій описана технологія генної терапії для лікування форм ахроматопсії у собак. Ахроматопсія або повна колірна сліпота, використовується у вигляді ідеальної моделі для розробки методів генної терапії, спрямованих на конусні фоторецептори.
- У **2012** році вчені з іспанського Національного онкологічного наукового центру (*Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas, CNIO*) під керівництвом його директора Марії Бласко довели, що тривалість життя мишей можна збільшити однократним введенням препарату, що безпосередньо впливає на гени тварини в дорослому стані. Вони зробили це за допомогою генної терапії – стратегії, яка ще жодного разу не використовувалася для боротьби зі старінням.
- У листопаді **2012** року Єврокомісія вперше дозволила випуск і продаж в ЄС ліки нідерландської компанії UniQure – *Glybera* – на основі генотерапії для лікування важкого генетичного захворювання – ліпопротеїноліпазної недостатності. Вартість ліків складала 1,6 млн доларів США, що на той час було рекордом за всю історію медицини. Однак, на жаль, через високу ціну, ліцензію на препарат більше не було продовжено. Ліки

отримали лише 31 людина в усьому світі, більшість із яких пройшли безкоштовне лікування під час клінічних випробувань.

- У 2016 році було схвалено препарат *Strimvelis* показаний для лікування людей із тяжким комбінованим імунodefіцитом через дефіцит аденозиндезамінази.
- У 2017 році схвалено препарат *Kymriah* для лікування В-клітинного гострого лімфобластного лейкозу, який використовує власні Т-клітини організму для боротьби з раком.
- У 2017 році схвалено препарат *Luxturna* для лікування вродженого амаврозу Лебера (спадкова хвороба сітківки).
- У 2018 році було схвалено *Onpattro* (Патісіран) – синтетичний лікарський препарат олігонуклеотидної природи, який пригнічує синтез білка транстиретину шляхом РНК-інтерференції. Розроблений для лікування рідкісного спадкового захворювання – спадкової амілоїдної полінейропатії.
- У 2019 році було схвалено *Zolgensma* – перший лікарський препарат для генної терапії спінальної м'язової атрофії. Золгенсма занесена в Книгу рекордів Гіннеса як найдорожчі ліки в світі (його вартість 2,125 млн. доларів).
- У 2020 році групою вчених була проведена генотерапія для омолодження та відновлення нервового волокна сітківки. Старим мишам ввели за допомогою аденовірусу гени, які синтезують фактори Яманакі, які епігенетично омолоджують клітини. Таке омолодження клітин дозволило відновити штучно пошкоджений оптичний нерв – нервові волокна бувально вирости знову.
- У 2022 році завдяки новій формі редагування генів молода дівчина у Великій Британії, хвора на лейкемію, була вилікована за 6 місяців. Редагування основи та мультиплексування можуть забезпечити більш ефективне лікування CAR-T для пацієнтів з невиліковними раковими захворюваннями.
- У 2022 році голландські вчені з Інституту Губрехта, *UMC Utrecht* та *Oncode Institute* використали іншу форму редагування генів – первинне редагування – для виправлення мутації CRISPR, яка спричиняє муковісцидоз у стовбурових клітинах людини. Крім того, корейські дослідники з Університету Йонсей успішно використовували первинне редагування для лікування захворювань печінки та очей у дорослих мишей.

- Також у **2022** році регулятори схвалили кілька знакових клітинних і генних терапій, зокрема *Roctavian* для лікування гемофілії А, та *Hemgenix* для лікування гемофілії В, *Zyntelgo* для бета-таласемії, *Skysona* для церебральної адренолейкодистрофії, *Yescarta* і *Breyanzi* для неходжкінської лімфоми, *Tecartus* для мантийно-клітинної лімфоми, *Adstiladrin*, для лікування раку сечового міхура, а також *Carvykti* і *Abecma* для множинної мієломи.
- У **2023** році FDA (Управління їжі та ліків) схвалило першу генну терапію м'язової дистрофії Дюшена – *Elevidys* (Sarepta Therapeutics).

### Методи генотерапії.

Методи генної терапії соматичних клітин можна поділити на дві великі категорії:

- генна терапія *ex vivo* (поза тілом).
- генна терапія *in vivo* (всередині тіла).

Обидва типи генної терапії використовують **вектор**, або молекулу-носії для гена. Вектор допомагає включити потрібний ген в ДНК пацієнта. Зазвичай цим вектором є модифікована вірусна ДНК, в якій були видалені вірусні гени.

## КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які міжнародні регулюючі акти з біобезпеки біотехнології, зокрема генної інженерії ви знаєте?
2. Проаналізуйте можливі наслідки впливу ГМО на здоров'я людини.
3. Проаналізуйте можливі наслідки впливу ГМО на довкілля.
4. Які, на вашу думку, ризики, пов'язані із біотехнологіями є найбільш непередбачуваними? Обґрунтуйте відповідь.
5. У чому полягає загроза біотехнологій для збереження видового різноманіття.
6. Яким чином можна використати надбання генетичної інженерії для усунення екологічної кризи?
7. Назвіть області застосування генної інженерії рослин і тварин.
8. Що таке генотерапії? Які успіхи у її розвитку?

# **ТЕХНОЛОГІЧНА БІОНЕРГЕТИКА І БІОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ ПЕРЕРОБКИ МІНЕРАЛЬНОЇ СИРОВИНИ**

## **ПЛАН**

1. Біотехнологія у вирішенні енергетичних проблем. Отримання біогазу, спирту із промислових і сільськогосподарських відходів.
2. Біогеотехнологія металів.
3. Використання мікроорганізмів у процесах видобутку корисних копалин.

## **1. БІОТЕХНОЛОГІЯ У ВИРІШЕННІ ЕНЕРГЕТИЧНИХ ПРОБЛЕМ. ОТРИМАННЯ БІОГАЗУ, СПИРТУ ІЗ ПРОМИСЛОВИХ І СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ВІДХОДІВ**

Особливо актуальною в останні два десятиліття стала необхідність розробки нових і ефективних способів виробництва енергетичних носіїв та поповнення сировинних ресурсів. У цьому зв'язку стали інтенсивно розвиватися нові розділи біотехнології – **біоенергетика і біогеотехнологія металів**.

За історію розвитку людського суспільства споживання енергії в розрахунку на одну людину зросла більш ніж у 100 разів. Через кожні 10-15 років світовий рівень споживання енергії практично подвоюється, при цьому запаси традиційних джерел енергії – нафти, вугілля, газу виснажуються.

Крім того, спалювання викопних видів палив призводить до наростаючого забруднення навколишнього середовища. Тому стає дуже важливим отримувати енергію в екологічно чистих технологіях.

Невичерпним джерелом енергії на Землі є Сонце. Кожен рік на поверхню Землі з сонячною енергією надходить  $3 \times 10^{24}$  Дж енергії. У той же



час розвідані запаси нафти, вугілля, природного газу та урану, за оцінками, еквівалентні  $2,5 \times 10^{22}$  Дж. Тобто менш ніж за один тиждень Земля отримує від Сонця таку ж кількість енергії, яка міститься у всіх запасах. Щорічно в процесах фотосинтезу утворюється понад 170 млрд т сухої речовини, а кількість енергії, зосередженій у ній, більш ніж в 20 разів перевищує сьгоднішнє річне енергоспоживання.

Тобто у глобальному масштабі сонячна енергетика здатна забезпечити сучасний і майбутній рівень енерговитрат людства.

Сьогодні у перспективі розглядається можливість засвоєння сонячної енергії, падаючої на пустелі. Її величина становить близько  $5 \times 10^{18}$  кВт/год. При освоєнні цієї енергії хоча б з 5%-м ККД рівень світового виробництва енергії можна збільшити більш ніж в 200 разів. Таким чином, при можливому народонаселенні в 10 млрд людей одержання енергії тільки з поверхні зони пустель буде в 10-12 разів перевищувати енергетичні потреби людства.

Принципово можливе також освоєння сонячної енергії, падаючої на поверхні морів і океанів. При цьому в первинному процесі перетворення сонячної енергії відбувається за рахунок синтезу біомаси фітопланктону; вторинний процес являє собою конверсію біомаси в метан і метанол. Плантації мікроводоростей за оцінками фахівців являють собою найбільш продуктивні системи: 50-100 т / га в рік.

Перетворення біомаси сухої речовини в енергію здійснюється в процесі згорання, в результаті якого виділяється тепло, що перетворюється далі в механічну або електричну енергію. Сира біомаса також може бути перетворена в енергію в процесах біометаногенезу і отримання спирту, що ґрунтуються на поєднанні фотосинтезу, тваринництва, кормовиробництва та ферментації з використанням тих чи інших біологічних агентів.

Тобто, найбільш ефективні і обнадійливі для великомасштабного перетворення сонячної енергії – методи, засновані на використанні біосистем.

## 1.1. Біометаногенез

Біометаногенез або метанове «бродиння» – давно відомий процес перетворення біомаси в енергію. Відкрито даний процес в 1776 році Вольтю, який встановив наявність метану в болотному газі. Біогаз, одержуваний з органічної сировини в ході біометаногенезу в результаті розкладання складних органічних субстратів різної природи, являє собою суміш з 65-75% метану і 20-35% вуглекислоти, а також незначних кількостей сірководню, азоту, водню. 1 м<sup>3</sup> біогазу еквівалентний 4 кВт/год електроенергії; 0,6 л гасу; 1,5 кг вугілля і 3,5 кг дров. Неочищений біогаз використовують у побуті для обігріву помешкань і приготування їжі, а також застосовують в якості палива в стаціонарних установках, що виробляють електроенергію. Після попереднього очищення біогаз можна використовувати в якості пального для двигунів внутрішнього згорання. Очищений біогаз аналогічний природному газу.

У процесах біометаногенезу вирішується не тільки проблема відтворення енергії, а й екологічні проблеми, що дозволяють вирішувати проблему утилізації та переробки відходів різних виробництв і технологій, сільськогосподарських і промислових, а також побутових, включаючи стічні води і тверді побутові відходи міських звалищ.

У складних процесах деструкції органічних субстратів і утворення метану бере участь мікробна асоціація різних мікроорганізмів. В асоціації присутні

- 1) *мікроорганізми-деструктори* (представники родів *Enterobacteriaceae*, *Lactobacilaceae*, *Streptococcaceae*, *Clostridium*, *Butyrivibrio*, а також целюзоруйнуючі мікроорганізми, оскільки до процесу біометаногенезу залучаються рослинні біомаси, що характеризуються високим вмістом целюлози), що викликають гідроліз складної органічної маси з утворенням органічних кислот (масляної, пропіонової, молочної), а також нижчих спиртів, аміаку, водню;
- 2) *ацетогени*, що перетворюють ці кислоти в оцтову кислоту, водень і окиси вуглецю;
- 3) *метаногени* – мікроорганізми, що відновлюють воднем кислоти, спирти і окиси вуглецю в метан.

Метаноутворюючі бактерії виділені і описані зовсім недавно (в середині 80-х років), вони досить широко поширені в природі в анаеробних зонах і разом з іншими мікроорганізмами беруть активну участь в деструкції органічних речовин з утворенням біогазу, в морських осадах, болотах, річкових і озерних мулах. До теперішнього часу виділено в чистій культурі та описано близько 30 метаноутворюючих бактерій; список цей безперервно поповнюється. Найбільш вивчені *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanosarcina barkerii*, *Methanobrevibacter ruminantium*. Особливість метаноутворюючих бактерій – здатність активно розвиватися в тісному симбіозі з іншими групами мікроорганізмів, що забезпечують метаногени умови та субстратами для утворення метану.

У процесах метаногенезу можна переробити найрізноманітнішу сировину – різну рослинну біомасу, включаючи відходи деревини, неїстівні частини сільськогосподарських рослин, відходи переробної промисловості, спеціально вирощені культури (водяний гіацинт, гігантські бурі водорості), рідкі відходи сільськогосподарських ферм, промислові і побутові стоки, мул очисних споруд, а також сміття міських звалищ. Важливо, що сировина з високим вмістом целюлози, що важко піддається методам переробки, також ефективно зброджується і трансформується в біогаз.

Установки для біометаногенезу з урахуванням їх обсягів і продуктивності можна підрозділити на кілька категорій:

- реактори для невеликих ферм сільській місцевості (1-20 м<sup>3</sup>),
- реактори для ферм розвинених країн (50-500 м<sup>3</sup>),
- реактори для переробки промислових стоків (спиртової, цукрової промисловості) (500-10 000 м<sup>3</sup>)
- реактори для переробки твердого сміття міських звалищ (1-20x10<sup>6</sup> м<sup>3</sup>).

Метанотенки, виготовлені з металу або залізобетону, мають різноманітну форму, включаючи кубічну і циліндричну.

Існує величезна різноманітність установок для реалізації процесу метаногенезу, конструкційні деталі і компоновка яких визначається пріоритетністю завдання, розв'язуваної в конкретному процесі: або це утилізація відходів і очищення стоків, або одержання біогазу необхідної якості. Так, серед діючих в розвинених країнах установок є як середні, так і великі за

обсягами апарати (дайджестери), забезпечені пристроями для очищення і накопичення біогазу, електрогенераторами і очисниками води. Такі установки можуть входити до складу комплексів з промисловими підприємствами (цукропереробних, спиртових, молокозаводів), каналізаційними станціями або великими спеціалізованими фермами. Коли головна мета процесу – утилізація відходів, у складі установок повинен бути присутнім блок для фракціонування і відділення великих твердих частинок.

Найпростіша конструкція метанотенка – це звичайна бродильна яма в ґрунті з фіксованим обсягом газу. Метанотенк являє собою герметичну ємність, частково занурену в землю для теплоізоляції і забезпечену пристроями для дозованої подачі і підігріву сировини, а також газгольдером – ємність змінного об'єму для збору газу. Дуже важливим у конструкції метанотенків є забезпечення необхідного рівня перемішування гетерогенного вмісту апарату. Разом з тим відомо, що максимальне виділення метану спостерігається в системах зі слабким перемішуванням.

Тому на відміну від аеробних процесів, що вимагають інтенсивної аерації і перемішування, перемішування при метаногенезі головним чином, повинно забезпечувати гомогенізацію маси, що бродить, перешкоджати осіданню твердих частинок і утворенню твердої плаваючої кірки.

В залежності від типу вихідного матеріалу, зброджуваного в метанотенку, інтенсивність процесу, включаючи швидкість подачі і повноту переробки, а також склад утвореного біогазу істотно варіюють. При переробці рідких відходів тваринницьких ферм співвідношення між твердими компонентами і водою в завантажуваній масі має становити приблизно 1:1, що відповідає концентрації твердих речовин від 8 до 11% за вагою. Суміш матеріалу зазвичай засівають ацетогенними і метаноутворюючими мікроорганізмами з відстою зброженої маси від попереднього циклу або іншого метанотенку. Температура і, отже, швидкість протікання процесу залежать від виду використовуваних метанових мікроорганізмів. Для термофільних організмів процес реалізується при 50-60 °С, для мезофільних – при 30-40 °С і близько 20 °С – для психрофільних організмів. При підвищених температурах швидкість процесу в 2-3 рази вища в порівнянні з мезофільними умовами.

Процеси, що протікають при метановому бродінні, ендотермічні і вимагають підведення енергії у вигляді тепла ззовні. Для підігріву зава-

нтажуваної сировини і стабілізації температури процесу на необхідному рівні зазвичай спалюють частину утвореного біогазу. В залежності від температури процесу кількість біогазу, що йде на обігрів процесу, може досягати 30% від обсягу одержуваного.

Швидкість надходження сировини на переробку або час утримання сировини в апараті є важливими і контрольованими параметрами. Чим інтенсивніший процес бродіння, тим вища швидкість завантаження і менший час утримання. Однак важливою умовою стабільності процесу біометаногенезу, як і будь-якої проточної культивацийної системи, є збалансованість потоків субстрату зі швидкістю розмноження продуцента.

Норми завантаження сировини в існуючих процесах метаногенезу коливаються в межах 7-20% обсягу субстрату від обсягу біореактора на добу.

Циклічність процесу – 5-14 діб. Зазвичай час зброджування тваринницьких відходів становить близько двох тижнів. Рослинні відходи переробляються довше (20 діб і більше). Найбільш важкі для переробки тверді відходи, тому їх переробка триваліша.

В результаті модифікації та удосконалення процесу можна суттєво змінити швидкість потоку сировини через метанотенк. Циклічність процесу може бути скорочена до 5-15 годин при збільшенні швидкості завантаження до 150-400% від загального добового обсягу. Інтенсифікувати процес можна в результаті використання термофільних мікроорганізмів і підвищення температури процесу, але це вимагає відповідних додаткових енерговитрат.

Ефективно також просторове розділення процесу відповідно до характерної для нього з точки зору хімізму процесу двофазності.

Процес реалізується в двох з'єднаних послідовно реакторах. У першому апараті відбувається процес анаеробного розкладання органіки з утворенням кислот, оксидів вуглецю та водню (кислотна стадія). Параметри процесу бродіння в апараті задаються на рівні, що забезпечує необхідний вихід кислот і рН культури не вище 6,5. Отримана бражка поступає в другий апарат, в якому відбувається процес утворення метану. У такій системі можна незалежно варіювати умови ферментації (швидкість потоку, рН, температуру) в кожному апараті з урахуванням створення



оптимальних умов для розвитку мікроорганізмів деструкторів в першому і метаногенів – у другому. В цілому, застосування такої біосистеми дозволяє інтенсифікувати процес в 2-3 рази.

В залежності від типу сировини та інтенсивності процесу біометаногенезу вихід біогазу коливається від 300 до 600 м<sup>3</sup> х т органічної маси при виході метану від 170 до 400 м<sup>3</sup>/т. Глибина переробки субстрату при цьому може складати від 20 до 70%.

Утворений в процесах метаногенезу рідкий або твердий шлам вивозиться на поля і використовується в якості добрив. Дане застосування обумовлене умовами метаногенерації, при якій патогенні ентеробактерії, ентеровіруси, а також паразитарні популяції (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma*) практично повністю гинуть. Твердий залишок процесу (або активний мул) може бути використаний також в якості вихідної сировини для отримання ряду біологічно активних сполук в процесах хімічного гідролізу або мікробіологічного синтезу.

Екологічна безпека застосування і калорійність біогазу в поєднанні з простотою технології його одержання, а також величезна кількість відходів, що підлягають переробці, – все це є позитивним чинником для подальшого розвитку і поширення біогазової промисловості.

Поштовхом до створення даного ефективного біотехнологічного напрямку послужила енергетична криза, що вибухнула в середині 70-х роках. Виробництво біогазу стало одним з основних принципів енергетичної політики ряду країн Тихоокеанського регіону. Уряд Китаю приділив більше уваги і вклав багато коштів у становлення біогазової промисловості, особливо в сільській місцевості. В рамках національної програми були створені умови для появи мережі заводів, що випускають біогазові установки. Уряд заохочував цей напрямок і пішов навіть на створення мережі регіональних і місцевих контор, відповідальних за біогазову програму. Державні банки надавали населенню пільгові позики та матеріали для будівництва установок. І вже в 1978 році, через три роки після прийняття програми в країні функціонувало понад 7 млн. установок, що в 15 разів перевершувало рівень 1975 році. У рік вироблялося близько 2,6 млрд. м<sup>3</sup> біогазу, що еквівалентно 1,5 млн. т нафти. На початку 80-х років у Китаї вироблялося до 110 млрд. м<sup>3</sup> біогазу, що еквівалентно



60-80 млн. т сирої нафти, а в середині – створено до 70 млн. установок, які приблизно у 70% селянських сімей покривали побутові потреби в енергії.

В Індії також велику увагу було приділено отриманню енергії в процесах біометаногенезу при утилізації сільськогосподарських відходів. Будівництво біогазових установок почалося на Філіппінах, в Ізраїлі, країнах Латинської Америки. Інтерес до даної технології в середині 80-х років посилювався також в країнах центральної Європи, особливо ФРН і Франції. У середині 90-х років в країнах Європейського економічного співтовариства функціонувало близько 600 установок з виробництва біогазу з рідких сільськогосподарських відходів і близько 20, що переробляли тверде міське сміття. У передмістях Нью-Йорка установка з переробки вмісту міського звалища виробляє близько 100 млн м<sup>3</sup> біогазу на рік. Інтегровані національні програми багатьох країн Африки і Латинської Америки, що мають величезні кількості сільськогосподарських відходів (понад 90% світових відходів цитрусових, бананів і кави, близько 70% відходів цукрового очерету і близько 40% відходів світового поголів'я худоби), в даний час орієнтовані на отримання біогазу.

## ***1.2. Отримання спирту***

Отримання етилового спирту на основі дріжджів відомо з давніх часів. В останні роки все більших масштабів набуває хімічний синтез етанолу з етилену, який конвертується в спирт при високій температурі в присутності каталізатора та води. Однак мікробіологічний синтез не втрачає актуальності.

Перспективи використання нижчих спиртів (метанолу, етанолу), а також ацетону та інших розчинників в якості пального для двигунів внутрішнього згоряння викликали в останні роки великий інтерес до можливості їх великомасштабного отримання в мікробіологічних процесах з використанням різної рослинної сировини. Етиловий спирт є прекрасним екологічним чистим паливом для двигунів внутрішнього згоряння. Заміна дефіцитного бензину іншими видами пального – актуальна проблема сучасності. Особливо гостро питання стоїть в країнах Америки та Західної Європи. Використання чистого етанолу або в суміші з бензином

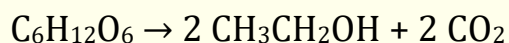
(газохол) істотно знижує забруднення навколишнього середовища вихлопними газами, так як при згорянні етанолу утворюються тільки вуглекислота і вода.

Тому в країнах з великими запасами природного рослинного матеріалу і відповідними ґрунтово-кліматичними умовами, що забезпечують великі щорічні урожаї, стає доцільним орієнтувати виробництво моторних палив на процеси мікробіологічного бродіння.

В якості пального спирт почали застосовувати в США і Німеччині у 30-40 роках. Інтерес до спиртів в якості палива різко зріс в 70-ті роки. Наприклад, у Бразилії етанол використовують в якості палива в двигунах внутрішнього згорання уже кілька десятиліть. У 1982 році почалося інтенсивне будівництво спиртових заводів за технологією шведської фірми «Альфа Ляваль» продуктивністю до 150 тис. л 95% спирту на добу на основі цукровмісної сировини. У Росії діють установки з виробництва гідролізного спирту технології Внігідроліз. В Японії до кінця 90-х років експорт нафти було скорочено з 72 до 49% за рахунок отримання спирту на основі імобілізованих мікробних клітин.

Сировиною для процесів спиртового бродіння можуть бути різноманітні біомаси, включаючи крохмалвмісні (зерно, картопля), цукровмісні матеріали (меляса, відходи деревопереробної промисловості), а також біомаса спеціально вирощених прісноводних і морських рослин і водоростей. Процес складається з декількох стадій, що включають підготовку сировини, процес бродіння, відгін і очищення спирту, денатурацію, переробку кубових залишків.

Етиловий спирт зазвичай отримують з гексоз в процесах бродіння, що викликаються бактеріями (*Zyomonas mobilis*, *Z. anaerobica*, *Sarcina ventriculi*), клостридії (*Clostridium thermocellum*) і дріжджами (*Saccharomyces cerevisiae*):



Головне завдання, яке доводиться вирішувати при одержанні спиртів технічного призначення, – це заміна дорогих крохмалвмісних субстратів дешевою сировиною нехарчового призначення.

Процеси, що відбуваються при конверсії цукровмісного субстрату в спирт, включають також процеси метаболізму і росту клітин-

продуцента, тому в цілому біологічний процес отримання спиртів залежить від ряду параметрів (концентрації субстрату, кисню, а також кінцевого продукту). При накопиченні спирту в культурі до певних концентрацій починається процес інгібування клітин. Тому велике значення набуває отримання особливих штамів, резистентних до спирту.

Побічними продуктами спиртового бродіння є вуглекислота, сивушні масла, кубові залишки, дріжджі. Кожен з цих продуктів має певну вартість і самостійну сферу застосування.

Спроби вдосконалення процесу бродіння можливі в декількох напрямках. Це перехід на безперервні процеси, отримання більш стійких до спирту штамів дріжджів і здешевлення вихідної сировини. Безперервні процеси зброджування дозволяють підвищити кінцеву концентрацію спирту до 12%. Отримано нові штами, в основному серед бактеріальних культур, стійкі до таких концентрацій спирту. До розробок останніх років відноситься напрям, заснований на використанні не вільних, а іммобілізованих мікробних клітин. Іммобілізовані клітини, володіючи підвищеною толерантністю до спирту, дозволяють вирішувати одночасно задачу оптимізації за двома параметрами: підвищувати повноту використання субстрату і кінцевий вихід спирту.

Випуск спиртів в якості моторних палив передбачає великі обсяги їх виробництва. В якості вихідного субстрату для отримання технічного спирту економічно виправдано використання відходів цукрової тростини, а також маніоку, батату, солодкого сорго, тапіамбура. Однак ці культури характерні для країн з теплим кліматом, наприклад Латинської Америки. Для регіонів з помірним кліматом, що мають великі масиви лісів, прийнятним виявляється використання гідролізатів відходів деревини. Але для цього потрібен досить енергоємний і дорогий процес руйнування лігніну і целюлози з утворенням водорозчинних цукрів. Процес гідролізу безперервно удосконалюється. Для підвищення виходу цукрів в процесі гідролізу та зниження енерговитрат розробляються нові методи деструкції лігноцелюлози з залученням фізичних, хімічних, ферментативних методів, а також в їх поєднанні. Крім відходів лісопиляння та деревообробки, можливе залучення також соломи, торфу, очерету.

Екологічні переваги отримання та застосування етанолу як палива очевидні. Економічні ж визначаються низкою умов: кліматом і продуктивністю зеленої біомаси, собівартістю сільськогосподарської продукції та наявністю (або відсутністю) енергоносіїв у вигляді нафти, природного газу або вугілля.

### **1.3. Рідкі вуглеводні**

Перші спроби пошуку серед фотосинтезуючих організмів потенційних продуцентів енергоносіїв у вигляді рідких вуглеводнів відносяться до 1978 року, коли дослідники намагалися виявити в соку деяких рослин, головним чином у представників сімейства молочайних, рідкі вуглеводні. Однак спроби не увінчалися успіхом, так як концентрація вуглеводнів у вищих рослин виявилася вкрай низькою. Дещо пізніше вдалося встановити здатність до синтезу рідких вуглеводнів у водоростей і бактерій.

Було показано, що у зеленої водорості *Botryococcus braunii* вміст вуглеводнів може складати від 15 до 75% від суми ліпідів. Ця одноклітинна зелена водорість зростає у водоймищах з прісною і солонуватою водою в помірних і тропічних широтах. Дана водорість існує у двох різновидах: червона і зелена, оскільки хлоропласти цієї водорості мають різне забарвлення, обумовлену присутністю пігментів у вигляді хлорофілів всіх типів, а також каротинів і їх окислених похідних (ксантофілів, лютеїну, неоксантину, зеоксантину та ін.) У несприятливих умовах росту, викликаних, наприклад, дефіцитом яких-небудь біогенів або підвищенням солоності середовища, співвідношення основних груп пігментів змінюється в бік домінування каротиноїдів, і тоді водорості набувають оранжево-червоне забарвлення. При дефіциті, наприклад іонів магнію в середовищі концентрація вуглеводнів в клітинній стінці досягає 70-75%. При цьому було виявлено, що зелена водорість синтезує лінійні вуглеводні з непарним числом вуглецевих атомів в ланцюгу (C<sub>25</sub>-C<sub>31</sub>) і бідним ненасиченими зв'язками. Червоний різновид синтезує лінійні вуглеводні з парним числом вуглецевих атомів в ланцюгу (C<sub>34</sub>-C<sub>38</sub>) і з декількома ненасиченими зв'язками. Дані вуглеводні, «ботріококцени», накопичуються водорістю в ростовій фазі в клітинній стінці. Вилучити вуглеводні без руйнування

клітин можна центрифугуванням біомаси водорості, в ході якого вуглеводні «впливають» із клітин. Останні можна знову помістити з середовища в умови акумуляції вуглеводнів. Варіюючи умови росту, освітленість, температуру, концентрацію солей, дослідники з Французького інституту нафти скоротили час подвоєння від семи до двох діб, при цьому вихід вуглеводнів становив 0,09 г / л на добу, що відповідає 60 т / га в рік. Фракція вуглеводнів, що синтезується водорістю, аналогічна гасу або дизельному паливу.

Ця водорість, як виявилось, досить широко поширена в природі, зустрічається в різних місцях: від солонуватих озер Австралії до водосховищ в околицях Лондона.

В даний час визнано ефективним використання цих вуглеводнів у фармацевтичній промисловості. У США діє ферма для вирощування водорості *V. braunii* із сумарною площею водойми 52 тис. га. Продуктивність процесу отримання вуглеводнів становить до 4800 м<sup>3</sup> на добу.

#### **1.4. Біологічне отримання водню**

Проблема отримання водню – одна з основних проблем технічного прогресу ряду найважливіших промислових галузей, в тому числі енергетики. Водень розглядається як головний енергоносі майбутнього, частково переважаючого основні сучасні енергоносії – нафту і природний газ. Теплотворна здатність водню досить висока (28,53 ккал/кг), це в 2,8 рази вище бензину. Водень легко транспортується і акумулюється в різних фазових станах; в газоподібному стані не токсичний, має високу теплопровідність і малу в'язкість в різних фазових станах. Але головна його перевага – екологічна чистота, єдиний побічний продукт його згоряння – вода.

За прогнозами експертів, енергетична система майбутнього сторіччя буде «водневою», тобто буде заснована на застосуванні двох енергоносіїв – електрики і водню, найбільш зручного для використання на транспорті і в промислових технологіях.

Створення майбутнього великомасштабного виробництва водню ставить перед наукою завдання пошуку найбільш економічних і екологі-

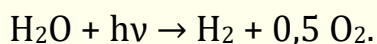
чних шляхів отримання водню з використанням таких джерел первинної енергії, як енергія розподілу важких елементів, термоядерного синтезу і сонячна. Проблема експлуатації сонячної енергії активно досліджується в даний час.

Це пов'язано як із загрозою зменшення запасів палива, так і з все більш гострими питаннями захисту навколишнього середовища, так як паливна енергетика відіграє не останню роль в тепловому і хімічному забрудненні повітряного і водного басейнів.

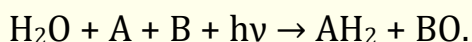
Кількість сонячної енергії, що падає на Землю, на багато порядків перевершує кількість всіх видів вторинної енергії. Тільки 0,1-0,2% сонячної енергії поглинається зеленими рослинами і тільки 1% утворених в процесі фотосинтезу продуктів використовується людиною в їжу. Тому все більш вимогливо постає завдання більш ефективного використання енергії Сонця. Сучасна наука шукає вирішення даної задачі в багатьох, в тому числі і біологічних напрямках. Особливо перспективним представляється отримання водню з використанням сонячної енергії з води, яка є найбільш дешевим і доступним субстратом. Запаси води в світовому океані складають  $1,3 \times 10^{18}$  т, тобто досить значні.

Отримання водню можливо в результаті електролізу води, а також термохімічного розкладання води з використанням відхідного тепла атомних станцій.

Вода може піддаватися прямому фоторуйнуванню під впливом сонячних променів:



Розробляються також способи одержання водню в результаті фотохімічного розкладання води. В основі способу лежать реакції, в яких бере участь фотосенсибілізатор (А) і нечутливі до світла сполуки (В); процес протікає у водному середовищі:



Цикл замикається реакціями:



Порівняно недавно показана можливість отримання водню розкладанням води за участю біокаталітичних агентів. Так, на початку 60-х років



було встановлено, що хлоропласти, виділені зі шпинату, в присутності штучного донора електронів і бактеріального екстракту, що містить фермент гідрогеназу, здатні продукувати водень. Через десятиліття дослідники в США встановили, що хлоропласти шпинату і бактеріальні структури, що містять гідрогеназу і ферредоксин в якості переносника електронів, після опромінення видимим світлом здатні утворювати водень.

Роботи по створенню систем біофотолізу води проводяться досить активно в багатьох країнах. Це призвело до створення різних типів систем. Ці системи, незалежно від природи складових її компонентів, повинні мати два елементи:

- 1) електрон-транспортну систему фотосинтезу, що включає систему розкладання води;
- 2) каталізатори утворення водню. В якості каталізаторів утворення водню можна використовувати як неорганічні каталізатори (металева платина), так і ферментативні (гідрогеназа).

Система біокаталітичного отримання водню є поки єдиним прикладом одностадійної системи, здатної працювати в видимих променях світла. Ця система надзвичайно цінна, оскільки працює на невичерпних джерелах енергії (сонячне світло) і сировини (вода) і виділяє при цьому екологічно чистий і висококалорійний енергоносіє – водень. Інтенсивне вдосконалення таких систем буде важливим етапом в процесах перетворення сонячної енергії в водень.

Перспективними, що розробляються напрямками є – отримання водню на основі зростаючих мікробних популяцій хемосинтезуючих і фотосинтезуючих організмів. Серед хемотрофних мікроорганізмів в якості продуцентів водню привертають увагу види, здатні рости на досить доступних і дешевих субстратах. Наприклад, культура клостридій *C. perfringens*, зброджуючи різну органіку, здатна продукувати в 10-літровому апараті до 23 л H<sub>2</sub> / год. Створення великомасштабної системи на такій основі не представляється важким, тому що вже розроблені і впроваджені в промисловість процеси отримання ацетобутилового бродіння з використанням клостридій.

Більш перспективними продуцентами є фототрофні мікроорганізми, так як утворення ними водню пов'язане з процесами поглинання енергії

світла і, отже, може підвищити ефективність використання сонячної радіації. З найбільшою швидкістю водень виділяють деякі пурпурні бактерії, наприклад деякі штами *Rh. capsulata*, до 150-400 мл Н<sub>2</sub>/год х г сухої речовини. В якості субстратів пурпурні бактерії використовують різні органічні сполуки, які вони розкладають з утворенням вуглекислоти і водню. Наприклад, при розкладанні 1 г лактату пурпурні бактерії утворюють до 1350 л водню. Важлива здатність пурпурних бактерій продукувати водень при використанні, крім органічних сполук, також тіосульфату та інших відновлених сполук сірки.

В якості субстрату можливе застосування також деяких відходів, включаючи гній. Ефективність продукції водню при цьому складає до 50 кг Н<sub>2</sub>/м<sup>2</sup> х г.

## 2. БІОГЕОТЕХНОЛОГІЯ МЕТАЛІВ

Біогеотехнологія металів – це процеси вилучення металів з руд, концентратів, гірських порід і розчинів під впливом мікроорганізмів або продуктів їх життєдіяльності при нормальному тиску і фізіологічній температурі (від 5 до 90 °С). Складовими частинами біогеотехнології є:

- 1) біогідрометалургія, або бактеріальне вилуговування;
- 2) біосорбції металів з розчинів;
- 3) збагачення руд.

*Бактеріальне вилуговування.* Важливість застосування біогеотехнології металів пов'язана з вичерпністю доступних природних ресурсів мінеральної сировини і з необхідністю розробки порівняно небагатих і важкоперероблюючих родовищ. При цьому біологічні технології не забруднюють навколишнє середовище.

Біогеотехнологічні методи, мікробіологічна адсорбція і бактеріальне вилуговування, дозволяють отримати додаткову кількість кольорових металів за рахунок утилізації «хвостів» збагачувальних фабрик, шламів та відходів металургійних виробництв, а також переробки так званих позабалансових руд, вилученням з морської води і стоків. Застосування біологічних методів інтенсифікує процеси видобутку мінеральної сировини, зде-

шевлює їх, при цьому виключає необхідність застосування трудомістких гірничих технологій; дозволяє автоматизувати процес.

В даний час процес бактеріального вилуговування для одержання міді досить широко застосовують повсюдно; менші масштаби має бактеріальне вилуговування урану.

У менших масштабах застосовується в гірничодобувній промисловості інший біотехнологічний процес – *вилучення металів з водних розчинів*. Цей напрямок обіцяє істотні перспективи, так як припускає досить дешеві процеси очищення стоків від металів і економічне одержання при цьому сировини.

Незважаючи на давність існування біотехнологічних процесів вилучення металів з руд і гірських порід, тільки в 50-ті роки була доведена активна роль мікроорганізмів в цьому процесі. У 1947 році в США Колмер і Хінклі виділили з шахтних дренажних вод мікроорганізми, що окислюють двовалентне залізо і відновлюють сірку. Мікроорганізми були ідентифіковані як *Thiobacillus ferrooxydans*. Незабаром було доведено, що ці залізоокислюючі бактерії в процесі окислення переводять мідь з рудних мінералів у розчин.

Потім були виділені і описані багато інших мікроорганізмів, що беруть участь у процесах окислення сульфідних мінералів. Через кілька років, в 1958 році, в США був зареєстрований перший патент на отримання металів з концентратів за допомогою залізоокислюючих мікроорганізмів. Бактерії *Thiobacillus ferrooxidans* дуже широко поширені в природі, вони зустрічаються там, де мають місце процеси окислення заліза чи мінералів. Вони в даний час найбільш вивчені. Крім *Thiobacillus ferrooxidans*, широко відомі також *Leptospirillum ferrooxidans*. Порівняно недавно виділені і описані бактерії *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *T. acidophilus*.

Для всіх цих мікроорганізмів процеси окислення неорганічних субстратів служать джерелом енергії.

Сульфідні мінерали ефективно окислюються бактеріями при наступних умовах: мікроорганізми повинні бути адаптованими до умов конкретної породи, їх концентрація в середовищі повинна бути достатньо високою (1-5 г/л). Вилуговування проходить активніше, якщо руда попере-

дньо тонко подрібнена до частинок розміром близько 40 мкм (зазвичай пульпи містять твердої речовини до 20%) при безперервному перемішуванні і аерації, а також стабілізації рН і температури середовища на рівні, оптимальному для мікроорганізмів.

Бактеріальне вилуговування в промислових масштабах досить широко застосовують для переводу міді та урану в розчинну форму. Існують декілька способів проведення бактеріального вилуговування металів. Всі вони засновані на стимуляції росту залізоокислюючих бактерій, здатних окислювати двовалентне залізо і сірку. Ці методи дуже економічні і чисті в екологічному плані; відрізняються достатньою простотою і здатні до самопідтримувannya.

Всі отримані при бактеріальному вилуговуванні продукти реакції перебувають в розчинах, які легко можна нейтралізувати; будь-які шкідливі побічні газоподібні продукти відсутні; процес не залежить від масштабів його проведення.

До труднощів реалізації біологічних методів відноситься необхідність підтримання активної мікробної культури в строго контрольованих і заданих умовах, найнижчі в порівнянні з хімічними процесами швидкості реакцій, взаємопов'язаність процесів вилуговування зі швидкостями росту мікроорганізмів.

### **3. ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ПРОЦЕСАХ ВИДОБУТКУ КОРИСНИХ КОПАЛИН**

Поверхнєве вилуговування куп і відвалів, в основному, зводиться до вилучення металів з відходів гірничодобувної промисловості або побічних бідних руд, переробка яких звичайними способами не економічна.

Методи поверхневого вилуговування куп і відвалів застосовують зазвичай при витяганні міді з порід з низьким її вмістом (менше 0,4% за вагою). Такі відвали накопичуються у великих кількостях при великомасштабній відкритій розробці руди, можуть займати величезні площі і досягати у висоту кількох сотень метрів. Найбільший відвал Бінгхем-Каньйон знаходиться в Америці та вміщує близько  $3,6 \times 10^8$  т породи.

Вилуговування куп дещо відрізняється від вилуговування відвалів. Купи містять підвищений в порівнянні з відвалами вміст металу, вилучення якого в принципі можливе за досить короткий термін – кілька місяців. У той же час вилуговування відвалів може тривати роками.

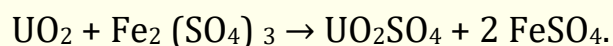
У купах і відвалах подрібнена руда покладена на похилу водонепроникну основу. Поверхні куп і відвалів зрошуються рідиною, що представляє собою слабкий розчин кислоти та іонів тривалентного заліза. Збір розчину з витягнутим металом, профільований через шар породи, збирають знизу. Оскільки при вилуговуванні відвалів в середовищі, як правило, розвиваються природні мікроорганізми, засіву не здійснюють. Кисле середовище і кисень сприяють підвищенню каталітичної активності *Thiobacillus ferrooxidans*. Вилугована рідина за допомогою насосів подається на верх купи руди, розпорошується по її поверхні і потім, самопливом стікаючи вниз, фільтрується через неї. Збагачені металом розчини, що стікають з відвалів і куп, направляються в спеціальні ставки і водойми для збору і вилучення металу.

Вилучення проводять методом простого осадження або електролізом, а також більш складними методами. Відпрацьовані розчини, що містять в основному розчинене залізо, регенеруються в окислювальних ставках і знову подаються у відвали.

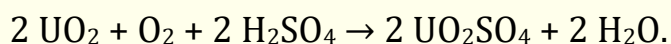
Швидкість вилучення металу при промисловому вилуговуванні куп і відвалів залежить від багатьох факторів – активності культури, якості руди і ступеня її дисперсності, швидкості фільтрації вилугованого розчину, аерації. Так, при введенні стисненого повітря в товщу вилугованої мідної руди швидкість вилучення міді зростає на 25%.

У цілому в США 15% міді отримують у процесах бактеріального вилуговування куп і відвалів.

Істотно рідше мікроорганізми застосовують для вилуговування в промислових масштабах урану. Для цього порода або руда повинні бути багаті сульфідними мінералами і не надто інтенсивно поглинати кисень. У східних районах Канади підземне бактеріальне вилуговування застосовують для вилучення залишкового урану на вироблених майданчиках, для цього стінки і дахи вибоїв промивають підкисленою водою. Розвиваються природні залізобактерії *Thiobacillus ferrooxidans*, які окислюють двовалентне залізо до тривалентного, яке окислює чотирьохвалентний уран до шестивалентного, переводячи його в розчин:



Можливе також пряме окислення урану бактеріями:



Через 3-4 місяці забої знову промивають. Промивні води, що містять уран, збирають; уран вилучають розчинниками або за допомогою іонного обміну.

Найбільш складний процес бактеріального вилуговування в апаратах – так зване чанове вилуговування. Цей тип вилуговування застосовують в гірничорудній промисловості для видобування урану, золота, срібла, міді та інших металів. Звичайне виробництво більшості металів на початковій стадії передбачає концентрування металомісткого мінералу з руди. У концентратах вміст металів може на порядок перевершувати їх концентрації у вихідних рудах і породах.

#### *Біосорбції металів з розчинів.*

Сьогодні вкрай необхідним є вдосконалення існуючих та розробка нових, більш ефективних методів очищення води від металів. Біологічні методи в останні роки знаходять все більше застосування для вилучення металів з промислових, а також побутових стічних вод. Ці методи, на відміну від дорогих фізико-хімічних, характеризуються достатньою простотою і ефективністю.

Зазвичай для цих цілей забруднені металами води збирають у відстійниках або ставках зі слабкою течією, де відбувається розвиток мікроорганізмів і водоростей. Ці організми накопичують розчинені метали внутрішньоклітинно або, виділяючи специфічні продукти обміну, переводять їх в нерозчинну форму і викликають осадження. Багато мікроорганізмів здатні накопичувати метали у великих кількостях. У ході еволюції в них сформувалися системи поглинання окремих металів і їх концентрування у клітинах.

Мікроорганізми, крім включення в цитоплазму, здатні також сорбувати метали на поверхні клітинних стінок, зв'язувати метаболітами в нерозчинні форми, а також переводити в летючу форму. Селекція в цьому напрямку і застосування нових генноінженерних методів дозволяють отримувати форми, що активно акумулюють метали, і на їх основі створювати системи біоочищення.



Ідея використання мікроорганізмів для вилучення металів з розчинів, крім величезного екологічного значення, важлива також в якості способу отримання економічно важливих металів.

За допомогою біосорбції навіть з розбавлених розчинів можливе 100% вилучення свинцю, ртуті, міді, нікелю, хрому, урану і 90% – золота, срібла, платини, селену.

Нещодавно встановлена здатність водоростей, дріжджів і бактерій (*Pseudomonas*) ефективно сорбувати уран з морської води.

Способи проведення біосорбції різні: можливо пропусканням розчину металів через мікробний біофільтр, що представляє собою живі клітини, сорбованих на вугіллі. Після концентрування металів мікроорганізмами на наступній стадії метали вилучають з мікробної біомаси. Для цього існують різні способи – як неструктурного, так і засновані на екстракції шляхом руйнування.

Таким чином, біологічні методи активно доповнюють і частково дозволяють замінити традиційні методи гірничодобувної галузі. Застосування біотехнологічних методів дозволяє збільшувати сировинні ресурси, забезпечує комплексне вилучення металів, не вимагає складної гірничої техніки; процеси легко піддаються регулюванню і автоматизації і дозволяють вирішувати багато природоохоронних завдань.

## **КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ**

1. Як вирішує енергетичні проблеми біотехнологія?
2. Отримання біогазу, спирту із промислових і сільськогосподарських відходів.
3. Що таке біометаногенез?
4. Як отримують спирт?
5. Рідкі вуглеводні, їх області застосування.
6. Опишіть біологічне отримання водню.
7. Що являє собою біогеотехнологія металів?
8. Як використовують мікроорганізми у процесах видобутку корисних копалин?

# **БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ПРОБЛЕМИ ЗАХИСТУ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА**

## **ПЛАН**

1. Принципи біологічних методів аеробної та анаеробної переробки відходів.
2. Анаеробні процеси очищення стоків.
3. Аеробні процеси очищення стоків.
4. Застосування біотехнологічних методів для очищення газоповітряних викидів і деградації ксенобіотиків.

## **1. ПРИНЦИПИ БІОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ АЕРОБНОЇ ТА АНАЕРОБНОЇ ПЕРЕРОБКИ ВІДХОДІВ**

Біотехнологія дозволяє вирішувати ряд екологічних проблем, включаючи захист навколишнього середовища від промислових, сільськогосподарських і побутових відходів, деградацію токсикантів, що потрапили в середовище, а також сама створює маловідходні промислові процеси одержання харчових і лікарських речовин, кормів, мінеральної сировини, енергії.

Використання та отримання величезної кількості продуктів в різних сферах людської діяльності супроводжується утворенням стічних вод, забруднених різноманітними органічними і неорганічними, в тому числі токсичними сполуками.

Стоки, що скидаються в природні водойми істотним чином впливають на якість води, порушують біологічну рівновагу в водоймах, тим самим ускладнюють раціональне водокористування, а в окремих випадках повністю виводять водойми з ладу. Скидання неочищених стічних вод негативно позначається на вмісті у воді розчиненого кисню, її рН, прозорості і кольоровості і т.д. Все це негативно впливає на стан компонентів водної екосистеми, знижує продуктивність і здатність водойм до самоочищення.

Органічні речовини, що потрапили у водойми, окиснюються до  $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$  в межах здатності водойм до самоочищення. Кількість кисню, що витрачається в цих процесах – біологічне споживання кисню (БСК) (*кількість кисню, витрачена на аеробне біохімічне окислення під дією мікроорганізмів і розкладання нестійких органічних сполук, що містяться в досліджуваній воді*), визначається концентрацією і спектром присутніх у воді домішок. Розрізняють БСК<sub>5</sub> (п'ятиденний), БСК<sub>20</sub> (двадцятиденний) і БСК<sub>повн</sub> (повний). БСК<sub>повн</sub> означає час, протягом якого всі речовини стоків окислюються у водоймі повністю до кінцевих продуктів. Стічні води являють собою складні системи з комплексом речовин, їх БСК складає від 200 до 3000 мг  $\text{O}_2$ /л. При скиданні у водойму таких стічних вод в неочищеному вигляді можливе повне витрачання запасів кисню. Тому перед скиданням стічних вод у природні водойми їх необхідно очищати до такої міри, при якій після скидання БСК залишається в межах санітарних норм (*для джерел централізованого господарсько-питного водопостачання і водних об'єктів, які використовуються у рибогосподарських цілях, БСК<sub>повн</sub> не повинне перевищувати 3 мг/л*).

Очищення стічних вод – це система методів, що викликають руйнування або видалення з них присутніх речовин, а також патогенних мікроорганізмів. У процесах природного самоочищення водойм у більшості випадків речовини, що надходять зі стоками піддаються руйнуванню. У ході цього процесу структура, властивості і концентрації речовин змінюються в часі і просторі. В результаті вода набуває початкові властивості. Таким чином, водойми відіграють роль природної очисної споруди.

Для очищення стоків застосовують декілька типів споруд:

- локальні (цехові);
- загальні (заводські);
- районні (міські).

*Локальні очисні споруди* призначені для очищення стоків безпосередньо після технологічних процесів. На локальних очисних спорудах очищують воду перед направленням її в систему оборотного водопостачання або в загальнорайонні очисні споруди. На таких установках зазвичай застосовують фізико-хімічні методи очищення (відстоювання, ректифікацію, екстракцію, адсорбцію, іонний обмін).

*Загальні очисні* споруди включають декілька ступенів очищення: первинну (механічну), вторинну (біологічну), третинну (доочищення).

*Районні або загальноміські* споруди очищають в основному побутові стоки методами механічної та біологічної очистки.

*Біологічний метод очищення* заснований на здатності мікроорганізмів використовувати в якості ростового субстрату різні сполуки, що входять до складу стічних вод. Переваги цього методу полягають у можливості видалення зі стоків широкого спектру органічних і неорганічних речовин, простоті апаратного оформлення та протікання процесу, відносно невисоких експлуатаційних витратах.

Для біологічного очищення стічних вод застосовують два типи процесів:

- анаеробні, при яких мікроорганізми не мають доступу до вільного розчиненого кисню. У цих процесах в якості акцептора електронів мікроорганізми можуть використовувати вуглець органічних речовин;
- аеробні, в яких мікроорганізми використовують для окислення речовин кисень.

При виборі між аеробними та анаеробними процесами перевагу зазвичай віддають першим. Аеробні системи більш надійні, стабільно функціонують та більше вивчені.

## **2. АНАЕРОБНІ ПРОЦЕСИ ОЧИЩЕННЯ СТОКІВ**

Анаеробні процеси очищення стічних вод не отримали достатньо широкого розвитку в даний час. Однак вони, в порівнянні з аеробними процесами очищення стічних вод, мають ряд переваг. Головними вважають високий рівень перетворення вуглецю забруднюючих речовин при відносно невеликих обсягах приросту біомаси і одержання додаткового цінного продукту – біогазу.

Анаеробні процеси для очищення стоків застосовуються в Європі близько 100 років. Використовувані для цих цілей *біореактори-септиктенки*, являють собою відстійники, в яких осівший мул піддається анаеробній деградації. Час перебування в них стоків, що очищаються іс-

тотно вищий – менше доби. При проектуванні біореакторів такого типу одним з основних параметрів є його місткість в літрах ( $V$ ), що розраховується з урахуванням кількості населення, що обслуговується  $P$ :

$$V = 180 P + 2000.$$

Мул септиктенків періодично (приблизно раз на рік) видаляється, а невелика його частина залишається в біореакторі.

Септиктенки застосовують у системі міських очисних споруд. У них переробляють стоки, що видаляються з первинних відстійників.

При зброджуванні обсяг мулу зменшується, знижується вміст в ньому патогенних мікроорганізмів і зникає неприємний запах. Шляхи біодеградації забруднюючих речовин, що протікають в септиктенках на основі складної мікробної асоціації, включають гідролітичні процеси за участю *ацидогенних, гетероацетогенних* бактерій і процес метаногенерації за участю *метаногенів*.

В цілому анаеробні процеси очищення стоків, володіючи рядом безперечних переваг, не знаходять поки такого широкого застосування, як аеробні системи біоочищення. Однак в останні роки, внаслідок більш суворих вимог до попереднього очищення промислових стоків перед скиданням їх у каналізацію, інтерес до анаеробних процесів зростає.

### **3. АЕРОБНІ ПРОЦЕСИ ОЧИЩЕННЯ СТОКІВ**

В аеробних процесах очищення частина окислюваних мікроорганізмами органічних речовин використовується в процесах біосинтезу, інша – перетворюється в нешкідливі продукти –  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $NO_2$  та ін.

Принцип дії аеробних систем біоочищення базується на методах проточного культивування.

Процес видалення органічних домішок складається з декількох стадій:

- 1) передачі органічних речовин і кисню з рідини до клітинної поверхні;
- 2) дифузії речовин і кисню всередину клітин через мембрану;
- 3) метаболізму, в ході якого відбувається приріст мікробної біомаси з виділенням енергії і вуглекислоти.

Інтенсивність і глибина біологічного очищення визначається швидкістю розмноження мікроорганізмів. Коли в стічних водах, що очищаються практично не залишається органічних речовин, настає другий етап очищення – нітрифікація. У ході цього процесу азотовмісні речовини стоків окислюються до нітритів і далі – до нітратів.

Таким чином, аеробне біологічне очищення складається з двох етапів: *мінералізації* – окислення вуглецевмісної органіки, і *нітрифікації*. Поява в стоках, що очищуються нітратів і нітритів свідчить про глибоку ступінь очищення. Більшість біогенних елементів, необхідних для розвитку мікроорганізмів (вуглець, кисень, сірка, мікроелементи), міститься в стічних водах. При дефіциті окремих елементів (азоту, калію, фосфору) їх у вигляді солей додають в стоки, що очищаються.

У процесах біологічного очищення бере участь складна біологічна асоціація, що складається не тільки з бактерій, але також включає одноклітинні організми – водні гриби, найпростіші організми (амеби, джгутикові та в'їчасті інфузорії), мікроскопічні тварини (коловертки, круглі черви – нематоди, водні кліщі) та ін. Ця біологічна асоціація в процесі біологічного очищення формується у вигляді активного мулу або біоплівки. Активний мул являє собою буро-жовті пластівці розміром 3-150 мкм, зважені у воді, і утворений колоніями мікроорганізмів, у тому числі бактеріями. Останні формують слизові капсули – зооглей. Біоплівка – це слизувате обростання матеріалу фільтруючого шару очисних споруд живими мікроорганізмами, товщиною 1-3 мм.

Біологічне очищення стоків проводиться в різних за конструкцією спорудах – біофільтрах і аеротенках.

**Крапельний біофільтр** – найбільш поширений тип біореактора з нерухомою біоплівкою, що застосовується для очищення стоків. По суті, це реактор з нерухомим шаром і протитечею повітря і рідини. Біомаса росте на поверхні насадки у вигляді плівки. Особливістю насадки або фільтруючого шару є висока питома поверхня для розвитку мікроорганізмів і велика пористість. Останнє сприяє проходженню повітря і рідини через нього.

Біофільтри являють собою прямокутні або круглі споруди з суцільними стінками і подвійним дном. Дренажне дно біофільтра складається



із залізобетонних плит з площею отворів не менше 5-7% від загальної площі поверхні фільтра.

Фільтруючим матеріалом зазвичай служить щебінь, галька гірських порід, керамзит, шлак. Нижній підтримуючий шар у всіх типах біофільтрів повинен містити більші частки фільтруючого матеріалу (розміром 60-100 мм).

Вхідний потік попередньо відстояних стічних вод за допомогою водорозподільного пристрою періодично рівномірно зрошує поверхню біофільтра. В ході просочування стічних вод через матеріал фільтруючого шару відбувається ряд послідовних процесів:

- 1) контакт з біоплівкою, що розвивається на поверхні частинок фільтруючого матеріалу;
- 2) сорбція органічних речовин поверхнею мікробних клітин;
- 3) окислення речовин стоків в процесах мікробного метаболізму.

Через нижню частину біофільтра протитечею рідини продувається повітря. Під час паузи між циклами зрошення сорбуюча здатність біоплівки відновлюється.

У біофільтрі відбувається безперервний приріст і відмирання біоплівки. Відмерла біоплівка змивається струмом води, що очищається і вивозиться з біофільтра. Очищена вода надходить у відстійник, в якому звільняється від часток біоплівки, і далі скидається у водойму.

Процес окислення органічних речовин супроводжується виділенням тепла, тому біофільтри обігріваються за рахунок власного тепла. Великі установки, забезпечені шаром теплоізоляційного матеріалу, здатні функціонувати при негативній температурі зовнішнього середовища. Однак температура всередині фільтруючого шару повинна бути не нижче 6 °С.

З початку 80-х років на зміну мінеральним матеріалам в біофільтрах прийшли пластмаси, що забезпечують велику пористість і кращі гідродинамічні властивості шару. Це дозволило будувати високі, біореактори, що не займають багато місця і очищати промислові стоки з високою концентрацією забруднюючих речовин. Питома поверхня пластмасових насадок, що використовуються для швидкого фільтрування, вища, ніж у щебених біофільтрів.

Щебеневі біофільтри, маючи більш низьку об'ємну щільність, можуть досягати висоти до 8-10 м. Цей тип біореактора при швидкому режимі фільтрації стоків забезпечує ступінь видалення 50-60% БПК. Для більш високого ступеня очищення застосовують каскад біофільтрів.

Експлуатація біофільтрів – нескладний процес. Важлива умова для ефективної роботи біофільтрів – ретельна попередня очистка стоків від зважених часток, здатних засмітити розподільний пристрій. Несприятливими моментами в експлуатації біофільтрів є ймовірність заливання, розмноження мух на поверхні, неприємний запах, внаслідок надлишкового утворення мікробної біомаси.

В даний час близько 70% очисних споруд Європи та Америки являють собою краплинні біофільтри. Термін служби таких біореакторів обчислюється десятками років (до 50). Основний недолік конструкції – надлишковий ріст мікробної біомаси. Це призводить до засмічення біофільтра і викликає збої в системі очищення. Запропонована нещодавно модифікація являє собою установку з почерговим подвійним фільтруванням. Система рециркуляції дозволяє виключити негативні моменти, характерні для біофільтрів.

**Аеротенк** відноситься до гомогенного біореактора. Типова конструкція біореактора являє собою залізобетонний герметичний посуд прямокутного перерізу, пов'язаний з відстійником. Аеротенк розділяється поздовжніми перегородками на кілька коридорів, зазвичай 3-4. Конструкційні відмінності ряду аеротенків пов'язані, в основному, з конфігурацією біореактора, методом подачі кисню, величиною навантаження.

Процес біоочищення в аеротенку складається з двох етапів. Перший етап полягає у взаємодії відстояних стічних вод, що містять близько 150-200 мг/л зважених часток і до 200-300 мг/л органічних речовин, з повітрям і частками активного мулу в аеротенку протягом деякого часу (від 4 до 24 год і вище в залежності від типу стоків, вимог до глибини очищення та ін.). На другому – відбувається розділення води і частинок активного мулу у вторинному відстійнику.

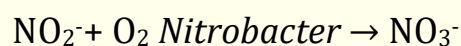
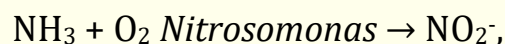
Біохімічне окислення органічних речовин стоків в аеротенку на першому етапі реалізується у дві стадії: на першій мікроорганізми акти-

вного мулу адсорбують забруднюючі речовини стоків, на другій – окислюють їх і відновлюють свою окислювальну здатність.

Подача повітря в «коридори» аеротенку здійснюється через пористі залізобетонні плити або через систему пористих керамічних труб. Зазвичай повітродозподільний пристрій розташовують не по центру, а близько однієї із стін коридору. У результаті цього в аеротенку відбувається турбулізація потоку, і стічні води не тільки просуваються уздовж коридору, але і закручуються по спіралі усередині нього. Це покращує режим аерації і умови очищення.

Процес очищення в аеротенках являє собою безперервну ферментацію.

У порівнянні з біоплівкою, що функціонує в біофільтрах, активний мул аеротенків являє собою меншу екологічну різноманітність видів. Основні групи бактеріальної компоненти активного мулу *флокулюючі бактерії, нитчасті бактерії та бактерії нітрифікатори*. Перша група бактерій не тільки бере участь у деградації органічних компонентів стоків, а й формує стабільні флокули (*структури більші пластівців*), що швидко осідають у відстійнику з утворенням щільного мулу. Нітрифікатори (*Nitrosomonas і Nitrobacter*) перетворюють відновлені форми азоту в окислені:



Нитчасті бактерії, з одного боку, утворюють скелет, навколо якого утворюються флокули, з іншого, – стимулюють несприятливі процеси (утворення піни і погане осадження). Найпростіші – споживають бактерії і знижують каламутність стоків (найбільше значення серед них мають інфузорії).

Мікроорганізми і найпростіші, що входять до складу активного мулу мають набір ферментів для видалення забруднень зі стоків. Концентрація активного мулу в аеротенку, зазвичай, становить 1,5-5,0 г/л. Ця величина залежить від рівня забруднень стоків, від віку мулу і його продуктивності.

Досвід експлуатації різних типів аеротенків показує, що вміст органічних речовин у стоках, що подаються на очищення, не повинно перевищувати 1000 мг/л. Оптимальна величина рН зазвичай лежить в діапазоні 6,5-8,5.

Приріст біомаси активного мулу в ході очищення призводить до його «старіння» і зниження біокаталітичної активності. Тому велика частина активного мулу після вторинного відстійника виводиться з системи, і тільки частина мулу повертається в реактор. Аеротенки технологічно пов'язані з вторинними відстійниками, в яких відбувається освітлення води, що виводиться та відділення активного мулу. Відстійники виконують також функцію контактних резервуарів. У них стічну воду хлорують. Дезинфікуюча доза хлору після біологічної очистки в залежності від якості очищення становить 10-15 мг/л при тривалості контакту хлору з рідиною не менше 30 хвилин.

*Біологічні (очисні) ставки* використовуються в якості самостійної очисної споруди або кінцевого пункту очищення стоків, що пройшли стадію біоочищення в біофільтрах або аеротенках. Якщо очисні стави функціонують як самостійні системи водоочищення, стічні води перед надходженням в них розбавляються трьох-, п'ятикратними обсягами технічної або господарсько-питної води.

Методи аеробної біологічної очистки стічних вод безперервно вдосконалюються. В останні роки стали впроваджуватися більш ефективні системи біоочищення. Це шахтні біореактори та процеси з використанням для аерування кисню. Такі біореактори називають *окситенками*. Концентрація розчиненого кисню в окситенках досягає 10-12 мг/л. Це в кілька разів перевищує рівень аерації в аеротенках. У результаті підвищеної аерації стоків концентрація активного мулу в них зростає до 15 г/л і їх окислювальна потужність в 4-5 разів перевершує аеротенки.

*Шахтні біореактори* дозволяють реалізувати процес очищення стоків аналогічно протіканню його в окислювальному каналі, але розташованому вертикально. Такі реактори займають невеликі площі і здебільшого заглиблені в ґрунт. Висота шахтних апаратів досягає 50-150 м при діаметрі 0,5-10,0 м.

## 4. ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ОЧИЩЕННЯ ГАЗО-ПОВІТРЯНИХ ВИКИДІВ І ДЕГРАДАЦІЇ КСЕНОБІОТИКІВ

Проблема боротьби з забрудненням повітряного басейну в умовах зростаючої технологічної діяльності набуває все більшої гостроти. У повітрі великих промислових міст міститься величезна кількість шкідливих речовин. При цьому концентрація багатьох токсикантів перевищує допустимі рівні. Основний внесок у забруднення атмосфери вносять підприємства нафтопереробної, хімічної, харчової та переробної промисловості, а також великі сільськогосподарські комплекси, відстійники стічних вод, установки по знешкодженню відходів.

Серед цих речовин – органічні (ароматичні і ненасичені вуглеводні, азото- кисне-, сірко- і галогеновмісні сполуки) та неорганічні речовини (сірчистий газ, сірковуглець, оксиди вуглецю, аміак та ін.). У повітряних басейнах великих промислових міст присутні десятки різних сполук, в тому числі з неприємним запахом, здатні навіть в незначних концентраціях становити загрозу для здоров'я, а також викликати у людей почуття дискомфорту.

Для очищення повітря застосовують різні методи – фізичні, хімічні і біологічні, проте рівень і масштаби їх застосування в даний час надзвичайно далекі від необхідних. Серед застосовуваних фізичних методів – абсорбція (*вибіркове поглинання речовини з газового чи рідкого середовища усім об'ємом твердого тіла чи рідини*) домішок на активованому вугіллі та інших поглиначів, абсорбція рідинами. Найбільш поширеними хімічними методами очищення повітря є озонування, прожарювання, хлорування. Біологічні методи очищення газоповітряних викидів почали застосовувати порівняно недавно, і поки в обмежених масштабах.

Біологічні методи очищення повітря базуються на здатності мікроорганізмів руйнувати в аеробних умовах широкий спектр речовин і сполук до кінцевих продуктів CO<sub>2</sub> і H<sub>2</sub>O. Широко відома здатність мікроорганізмів метаболізувати аліфатичні, ароматичні, гетероциклічні, ациклічні та різні C<sub>1</sub>-сполуки. Мікроорганізми утилізують аміак, окислюють сірчи-

стий газ, сірководень. Утворені сульфати утилізуються іншими мікробними видами. Є дані про ефективне окислення аеробними карбоксидобактеріями моноокису вуглецю (CO), що є одним з найбільш небезпечних повітряних забруднювачів. Представники роду *Nocardia* ефективно руйнують стерини і ксилол; *Huphomicrobium* – дихлоретан; *Xanthobacterium* – етан і дихлоретан; *Mycobacterium* – вінілхлорид.

Найбільш широким спектром катаболічних шляхів характеризуються ґрунтові мікроорганізми. Так, тільки представники роду *Pseudomonas* здатні використовувати в якості єдиного джерела вуглецю, сірки або азоту понад 100 сполук – забруднювачів біосфери.

Великі можливості для підвищення біосинтетичного потенціалу мікроорганізмів-деструкторів токсичних речовин мають на озброєнні у мікробіологів і генетиків, включаючи методи традиційної селекції і відбору, а також новітні досягнення клітинної та генетичної інженерії. Переважна кількість токсичних забруднювачів атмосфери може бути зруйнована монокультурами мікроорганізмів, але більш ефективним є застосування змішаних культур, що мають більший каталітичний потенціал.

Для біологічного очищення повітря застосовують три типи установок: *біофільтри, біоскрубери і біореактори з омиваючим шаром.*

Основним елементом *біофільтру* для очищення повітря, як і водоочисного біофільтру, є фільтруючий шар, який сорбує токсичні речовини з повітря. Далі ці речовини в розчиненому вигляді дифундують до мікробних клітин, включаються в них і піддаються деструкції.

В якості носія для фільтруючого шару використовують природні матеріали – компост, торф та ін. Ці матеріали містять у своєму складі різні мінеральні солі і речовини, необхідні для розвитку мікроорганізмів. Тому в біофільтри не вносять жодних мінеральних добавок. Повітря, що підлягає очищенню, подається вентилятором в систему, проходить через фільтруючий шар в будь-якому напрямку, знизу вгору або навпаки. При цьому повітря повинне проходити через всю масу фільтруючого шару рівномірно. Тому потрібна однорідність шару і певна ступінь вологості. У матеріалі не повинно виникати температурних градієнтів, а також не повинно відбуватися різких змін рН середовища. Тому температурний режим в біофільтрі підтримується постійним. Для цього повітря, що подається в біофільтр, підігрівається, установка в цілому термостатується.



Для забезпечення стабільної роботи біофільтрів слід дотримуватися комплексу заходів, найважливішими з яких є наступні. Повітря, що подається на очистку в біофільтр, попередньо зволожують в біоскрубері до відносної вологості в 95-100%. При заповненні фільтруючого шару для зниження аеродинамічного опору в матеріал додають гранули (діаметром 3-10 мм) з синтетичних полімерних матеріалів (поліетилену, полістиролу), а також частинки автопокришок, активоване вугілля. Маса добавок становить від 30 до 70% від маси фільтруючого матеріалу.

Для запобігання різкого закислення матеріалу фільтруючого шару в ході трансформації органіки в нього додають вапняк або карбонат кальцію в кількості 2-40% від ваги носія. З метою уникнення ситуацій, коли мікроорганізми, що входять до складу робочого тіла біофільтра, можуть інгібуватися токсичними речовинами в результаті, наприклад, залпових викидів, в матеріал вносять активоване вугілля, до 250 кг/м<sup>3</sup>.

Ефективність роботи біофільтра визначається газодинамічними параметрами фільтруючого шару, спектром і концентрацією присутніх в повітрі речовин і ферментативною активністю мікрорганізмів-деструкторів. При цьому швидкість видалення шкідливих домішок з повітря в процесі біоочищення може лімітуватися як дифузією речовин з газової фази в біокаталітичний шар, так і швидкістю протікання біохімічних реакцій в мікробних клітинах. При високій вхідній концентрації шкідливих речовин у повітрі процес їх деструкції в ході проходження потоку через фільтруючий шар нерівномірний. Спочатку руйнуються легкодоступні речовини, і тільки в кінці процесу починається руйнування важкодеградуючих сполук. Так, при наявності у повітрі в якості шкідливих домішок комплексу сполук бутанолу, етилацетату, бутилацетату і толуолу останній утилізується мікроорганізмами тільки після окислення всіх інших речовин.

Стаціонарний стан і найбільш висока швидкість біоочищення наступають через деякий час після запуску біофільтра. Потрібно певний період для дозрівання і адаптації мікробіологічного ценозу.

Тривалість періоду адаптації залежить від концентрації речовин в повітрі і мікробного складу в дифузійному шарі і може становити від декількох годин до декількох тижнів.

Принцип функціонування *біоскрubberів* відрізняється тим, що процес очищення повітря реалізується у дві стадії у двох різних установках. На першому етапі в абсорбері токсичні речовини, що знаходяться в повітрі, а також кисень розчиняються у воді. У результаті повітря виходить очищеним, а забруднена вода далі йде на очистку в аеротенк. Очищення води в аеротенку відбувається за звичайною схемою з участю кисню. В ході очищення складні органічні речовини окислюються мікроорганізмами, що формують активний мул, до кінцевих продуктів з утворенням біомаси.

*Біореактор з омиваючим шаром.* Робочим тілом цієї біосистеми є іммобілізовані мікроорганізми. Біошар реактора являє собою гранули з іммобілізованими мікробними клітинами. Цей шар омивається водою, що містить необхідні для розвитку клітин мінеральні речовини. Забруднене повітря проходить через нього, при цьому речовини, що підлягають деструкції, дифундують у водну плівку, що вкриває частинки біокатализатора, і далі окиснюються мікроорганізмами. Швидкість деструкції може лімітувати швидкістю дифузії речовин з газової фази в рідку, а також швидкістю протікання реакцій у мікробних клітинах. Швидкість дифузії, в свою чергу, залежить від природи токсичних речовин і їх концентрацій. Стаціонарний режим біореактора з омиваним шаром після його запуску настає через 5-10 днів. При використанні заздалегідь адаптованих до очищувальних речовин мікроорганізмів цей термін може бути скорочений до декількох годин. Періодично, зазвичай раз на кілька місяців, біошар очищають від надлишку біомаси і наповнюють свіжими гранулами.

Основні вимоги, запропоновані до установок біологічної очистки газів, полягають у простоті і експлуатаційній надійності конструкції, високій питомій продуктивності та високому ступені очищення.

Масштаби промислового застосування методів біологічного очищення повітря в даний час досить незначні. Найбільш поширеним типом установок є біофільтри. Вони досить дешеві, малоенергоємкі, вимагають незначних витрат води. Однак продуктивність біофільтрів порівняно невисока – від 5 до 400 м<sup>3</sup> очищеного повітря на 1 м<sup>2</sup> поперечного перерізу фільтруючого шару/год. Головним чином, це визначається низьким вмістом мікроорганізмів в одиниці об'єму матеріалу фільтруючого шару. Висота біофільтрів через вимоги однорідності структури і газодинаміч-

них обмежень невелика (близько 1 м), тому вони займають великі площі (від 10 до 1600 м<sup>2</sup>).

Біоскрубери в порівнянні з біофільтрами займають меншу площу, тому що являють собою вежі висотою в кілька метрів. Експлуатаційні витрати при використанні біоскруберів вищі, так як процес біоочищення води вимагає істотних витрат. Застосування біоскруберів ефективно за наявності у повітрі добре розчинних токсичних речовин. Продуктивність біоскруберів істотно вища в порівнянні з біофільтрами, при цьому ефективність очищення також висока. Наприклад, застосування біоскруберів для очищення відхідних газів металургійних підприємств дає наступні показники: продуктивність 120 000 м<sup>3</sup>/год, зниження інтенсивності запаху повітря – від 75 до 85%, ступінь конверсії органічних домішок – 50%.

Найбільш перспективними для очищення повітря є біореактори з омиваючим шаром. Ці установки, практично не поступаючись в ступені очищення, характеризуються більш високою питомою продуктивністю (кілька тисяч кубометрів очищеного повітря за годину). Такі малогабаритні установки дуже ефективні для очищення повітря підприємств інтенсивного тваринництва. Ступінь очищення повітря в реакторі з іммобілізованими на активованому вугіллі мікроорганізмами від ацетону, бутанолу, пропіонового альдегіду, етилацетату сягає 90%.

Описано інші підходи для очищення повітря, наприклад, на основі зростаючої суспензії мікроорганізмів. Пропускання повітря, насиченого сірководнем, сірчистим ангідридом і парами сірчаної кислоти, через інтенсивну культуру мікроводорості *Chlorella*, що має велику поверхню контакту суспензії з повітрям, забезпечує 100%-не очищення повітря при продуктивності установки до 1 млн м<sup>3</sup>/год. Відомі способи комплексного очищення стоків та забрудненого повітря від аліфатичних кислот, спиртів, альдегідів і вуглеводнів в аеротенку з активним мулом.

Показана можливість ефективного очищення повітря ряду фармацевтичних виробництв на основі іммобілізованих мікробних клітин.

Утворені в багатьох виробничих процесах відновлені сполуки сірки (тіосульфат, сірководень, диметилсульфід) можуть служити джерелом енергії для багатьох мікроорганізмів. Один з методів очищення від сірководню полягає в пропусканні повітря через сольовий розчин міді.

Утворюваний в результаті цього нерозчинний сульфід металу далі може бути окислений за участю мікроорганізмів. Можливе створення системи біоочищення повітря від сірководню, а також органічних сполук сірки з використанням тіобацил.

Таким чином, в даний час в промислових масштабах застосовуються досить ефективні біологічні процеси для очищення газоповітряних викидів. Існують реальні наукові основи для розробки та впровадження нових методів біоочищення.

*Біодеградація ксенобіотиків.* Ксенобіотики – чужорідні для організмів сполуки (пестициди, ПАР, барвники, лікарські речовини та ін.), які практично не включаються до циклів вуглецю, азоту, сірки або фосфору. Ксенобіотики тимчасово або постійно накопичуються в навколишньому середовищі і шкідливо впливають на все живе.

Накопичення ксенобіотиків становить величезну небезпеку для людини, що вживає в їжу велику рибу і вищих тварин.

Деградація ксенобіотиків може відбуватися в результаті фізичних і хімічних процесів і суттєво залежить від типу ґрунту, його структури, вологості, температури та ін. Біологічна трансформація сполук, що потрапили в навколишнє середовище, може протікати в різних напрямках, призводячи до мінералізації, накопичення або полімеризації. Ксенобіотики, які піддаються повній деградації, тобто мінералізуються до діоксиду вуглецю, води, аміаку, сульфатів і фосфатів, використовуються мікроорганізмами в якості основних ростових субстратів і проходять повний метаболічний цикл. Часткова трансформація сполук відбувається, як правило, в процесах кометаболізму або співокислення і не пов'язана з включенням утворюваних продуктів в метаболічний цикл мікроорганізмів. Нарешті, деякі ароматичні вуглеводні і синтетичні полімери взагалі не піддаються біологічній трансформації.

Поведінка ксенобіотика в природі залежить від багатьох взаємопов'язаних факторів: структури і властивостей самої речовини, фізико-хімічних умов середовища і її біокаталітичного потенціалу, зумовленого мікробним складом. Всі ці фактори в сукупності визначають швидкість і глибину трансформації ксенобіотика. Не можна забувати про те, що біологічна деградація ксенобіотиків виправдана тільки тоді, коли відбува-

ється їх повна мінералізація, руйнування і детоксикація. Це може бути досягнуто в результаті всього однієї модифікації структури сполуки. Однак часто в ході деградації відбувається серія послідовних модифікацій вихідної сполуки за участю декількох мікробних видів. Важливу роль у видаленні ксенобіотиків з навколишнього середовища відіграють різноманітні типи мікробного метаболізму. У природних умовах на ксенобіотики впливають мікробні спільноти. Саме завдяки гетерогенності природних мікробних спільнот ксенобіотики в принципі можуть піддаватися біодеградації, а наявність в мікробних співтовариствах взаємопов'язаних метаболічних шляхів руйнування токсинів є основою для боротьби із забрудненням навколишнього середовища.

Є два шляхи для боротьби із забрудненням біосфери ксенобіотиками: збір та детоксикація ксенобіотиків до моменту потрапляння в навколишнє середовище і трансформація або видалення ксенобіотиків, які потрапили в середовище.

Можливості мікробних спільнот у відношенні деградації багатьох токсичних сполук значні. Доведено, що при повторному попаданні в середовище багатьох хімічних сполук час до початку їх трансформації (так званий адаптаційний період мікроорганізмів по відношенню до даного субстрату) значно коротший у порівнянні з першим попаданням цього з'єднання. Протягом цього періоду мікроорганізми в ході адаптації до токсичної сполуки як субстрату відбираються по здатності деградувати даний субстрат. В результаті природним шляхом виникають мікробні популяції, які, як виявилось, можуть зберігатися в ґрунті протягом декількох місяців після повної деградації токсиканту. Тому до моменту нового надходження цієї сполуки в ґрунт в ній уже присутні адаптовані мікроорганізми, здатні атакувати токсикант.

Таким чином, після потрапляння ксенобіотиків в навколишнє середовище з ґрунту можна виділити мікробні види, здатні деградувати конкретні ксенобіотики і далі серед них вести селекцію на збільшення швидкості деградації.

При попаданні нових речовин у навколишнє середовище може відбуватися природне генетичне конструювання, в результаті якого виникають мікробні форми з новими катаболічними функціями. Величезна



роль у процесах міжорганізмowego перенесення генетичної інформації, що призводять до біохімічної мінливості популяцій, належить плазмідам – позахромосомних генетичним елементам. Катаболічні, або деградатовні плазміди кодують реакції мінералізації або трансформації ксенобіотиків, надають мікроорганізмам здатність перерозподіляти між собою пул деградатовних генів. В даний час описані різноманітні природні катаболічні плазміди, що зустрічаються в різних представників ґрунтової мікрофлори. Особливо часто вони ідентифікуються серед роду *Pseudomonas*. Інформація, яку несуть плазміди, може розширити коло субстратів господаря за рахунок об'єднання двох метаболічних шляхів, або повним кодуванням нового шляху, або доповненням існуючих метаболічних шляхів.

Відомі також випадки перерозподілу генетичного матеріалу між плазмідами і хромосоною господаря, що призводять до появи зовсім нових генів. Пластичність катаболічних плазмід забезпечує перерозподіл генетичного матеріалу, що може призвести до виникнення в природі нового організму, ефективно деградує новий субстрат.

Таким чином, природні генетичні механізми обміну інформацією дозволяють отримувати ефективні штами-деструктори ксенобіотиків. Це тим більш важливо, так як загальноприйняті методи роботи з рекомбінантними ДНК, що застосовуються для клонування чужорідної ДНК з невеликим числом генів, мають суттєві обмеження при клонуванні метаболічних шляхів деградації ксенобіотиків, кодованих десятками генів. Обмеження також обумовлені недоліком знань про механізми деградації та структурі метаболічних шляхів, а також можливостями ризику, пов'язаного з потраплянням сконструйованих організмів в середовище. Методи генетичної інженерії можуть бути корисними для вдосконалення вже існуючих деградатовних здібностей мікробних клітин.

Біологічні методи також застосовуються для очищення природного середовища від нафтових забруднень, що представляють собою як стічні води нафтової промисловості, так і безпосереднє забруднення в результаті розливу нафти. Стічні води нафтової промисловості очищають біологічними методами після видалення більшої частини суміші різних вуглеводнів фізичними методами. Для цього застосовують аеруючі системи



біоочищення з активним мулом, що містить адаптоване до компонентів нафти співтовариство. Швидкість деградації залежить від якісного складу і концентрації вуглеводнів, а також температури і ступеня аерації середовища. Найбільш ефективно біодеградація здійснюється, коли нафта емульгована у воді.

Особливу проблему становлять викиди і аварійні розливи нафти на поверхню ґрунту. Це призводить до забруднення не тільки орних земель, але також і джерел питної води. У ґрунті міститься багато мікробних видів, здатних деградувати вуглеводні, але їх активність часто низька, в тому числі і в результаті дефіциту окремих біогенних елементів. У таких випадках ефективним є внесення в ґрунт так званих олеофільних добрив, до складу яких входять сполуки азоту, фосфати та інші мінеральні елементи, концентрації яких в ґрунті досить низькі і лімітують ріст мікроорганізмів. Після внесення цих сполук у ґрунт концентрація мікроорганізмів-деструкторів істотно зростає, і зростає швидкість деградації нафти. За допомогою генетичного конструювання створений «супермікроб», здатний утилізувати більшість основних вуглеводнів нафти.

Використання методів генетичного конструювання мікробних штамів-деструкторів ксенобіотиків для практичного застосування перебуває на ранній стадії. Одна з основних проблем при конструюванні мікроорганізмів на основі природних катаболічних плазмід – стабільність. Стабільність систем «господар-вектор» особливо важлива при інтродукції штамів в природне середовище. При поверненні мікроорганізму з новою катаболічною функцією у вихідне природне середовище йому доводиться конкурувати з добре адаптованою до даних умов середовища природною мікрофлорою, стикатися з величезною різноманітністю джерел вуглецю, у тому числі високотоксичних. При цьому абсолютно неясні перспективи збереження стабільності нової катаболічної функції і, отже, самого штаму.

Поки існує великий розрив між досягненнями, отриманими в конструюванні мікроорганізмів, і можливостями їх практичного застосування. Ймовірно, в майбутньому найбільш перспективними для детоксикації ксенобіотиків будуть біологічні системи, що складаються з мікробіологічної консорції індивідуальних організмів і мікробних спільнот, отриманих методами клітинної та генетичної інженерії.

## КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Опишіть яким чином біотехнологія вирішує очищення стічних вод?
2. Які є типи біологічних способів очищення стоків?
3. Опишіть анаеробні процеси очищення стоків.
4. Охарактеризуйте аеробні процеси очищення стоків.
5. Опишіть крапельний біофільтр та аеротенк.
6. Які установки використовують для біологічного очищення повітря?
7. Які є шляхи для боротьби із забрудненням біосфери ксенобіотиками?

# НАНОТЕХНОЛОГІЇ ТА НАНОБІОТЕХНОЛОГІЯ

## ПЛАН

1. Нанотехнологія, основні напрями і завдання нанотехнологій.
2. Нанобіологія та нанобіотехнологія.
3. Основні напрямки розвитку нанобіотехнологій.
4. Розвиток нанобіотехнологій в Україні.

## 1. НАНОТЕХНОЛОГІЯ, ОСНОВНІ НАПРЯМИ І ЗАВДАННЯ НАНОТЕХНОЛОГІЙ

Під *нанотехнологіями* розуміють фундаментальні технології, засновані на маніпуляціях з наноструктурами (наночастинками).

**Наноструктури** – це об'єкти, розміри яких лежать в діапазоні від 1 до 100 нанометрів (1 нанометр дорівнює  $10^{-9}$  м).

Наномасштаб унікальний, оскільки найбільш фундаментальні властивості матеріалів наносвіту залежать від їх розміру так, як не залежать ні при жодному іншому масштабі. Багато властивостей твердих тіл (температура плавлення, електропровідність, область прозорості, магнетизм та ін.) при зменшенні кристала до розмірів 10-20 нм і менше починають залежати від розміру. Таким чином, з'являється можливість створювати нові матеріали не шляхом зміни хімічного складу компонентів, а в результаті регулювання розмірів і форми частинок їх складових.

На молекулярному рівні проявляються нові властивості, які визначаються поведінкою молекулярних наноконкомплексів. Можливість розуміти, розробляти і контролювати ці властивості відкриває цілий світ функціональних молекулярних механізмів і технологій. Наноструктури не просто найменше, що створювала людина, вони є найменшими твердими матеріалами, які можна зробити (виділити) і з якими можна здійснити маніпуляції.

Багато джерел, в першу чергу англомовні, першу згадку методів, які згодом будуть названі **нанотехнологією**, пов'язують з відомим виступом **Річарда Фейнмана** «Там внизу багато місця», зробленим ним в 1959 році в Каліфорнійському технологічному інституті на щорічній зустрічі Американського фізичного товариства. Річард Фейнман припустив, що можливо механічно переміщати поодинокі атоми, за допомогою маніпулятора відповідного розміру. Фейнман висловив припущення, що в майбутньому багато матеріалів та пристроїв будуть виготовлятися на атомарному або молекулярному рівні і це допоможе отримувати матеріали з небаченими досі властивостями.

Термін «**нанотехнологія**» був вперше запропонований в 1974 р. професором Університету Токіо **Норіо Танігучі** для позначення процесів керування властивостями матеріалів на нанометровому масштабі.

У 1980-х роках цей термін використав **Ерік К. Дрекслер** в своїх книгах: «Машини створення: гряде ера нанотехнології». Центральне місце в його дослідженнях грали математичні розрахунки, за допомогою яких можна було проаналізувати роботу пристрою розмірами в декілька нанометрів.

Сьогодні на основі нанотехнологій розроблені консолідовані наноматеріали, нанопаівпровідники, нанополімери, нанобіоматеріали, фулерени, нанотрубки, наночастинки, нанопорошки, нанопористі матеріали, наноструктурні рідини (колоїди, міцели, гелі), фармакологічні нанопрепарати. У світлі сучасних технологій починають інтенсивно використовуватися наноматеріали (НМ) – дисперсні матеріали, що містять структурні елементи, геометричні розміри яких не перевищують 100 нм. Міжнародна організація зі стандартизації ISO (*International Organization for Standardization*) створила «Технічний комітет 229 – нанотехнології» (ISO/TC 229), метою якого є розробка міжнародних стандартів нанотехнології, номенклатури, метрології, специфікації, методології тестування, підготовка інструкцій для галузей охорони здоров'я та безпеки довкілля за використання наноматеріалів. Сьогодні, відповідно до вимог ISO, представлена детальна класифікація наночастинок і наноматеріалів за їх розмірами, структурою, хімічним походженням, властивостями.

Для прискореного розвитку нанотехнологій та ефективного застосування результатів майже у всіх країнах світу створюють спеціальні лабора-

торії, центри, інститути, комітети, у яких проводять дослідження з різних напрямів нанонауки. У США ще в 2000 р. створено науковий центр «Національна нанотехнологічна ініціатива», де зосереджено основні дослідження з цього наукового напрямку. У світі понад 50 країн упроваджують спеціальні програми розвитку нанотехнологій і постійно збільшують обсяги інвестицій у ці програми. Вони стали важливим фактором науково-технічного прогресу та інноваційної складової економіки багатьох країн. Підґрунтя ринку світових інвестицій становлять п'ятнадцять країн, серед них – США, Японія, Велика Британія, Німеччина, Ізраїль, Китай, Канада, Австралія та інші. У більшості з них частка державних витрат у сфері нанонауки і нанотехнологій перевищує 50% від загального обсягу фінансування.

В Україні також проводяться певні заходи для вирішення цієї важливої проблеми. Так, Кабінетом Міністрів України було затверджено Державну цільову науково-технічну програму «Нанотехнології і наноматеріали». Головною метою її було визнання стратегічної пріоритетності розробок нанотехнологій і наноматеріалів, їхнє використання на державному рівні, подолання відставання країни в здійсненні наукового і методичного забезпечення координації досліджень, формування і розвиток технологічної бази.

У сфері фундаментальних наукових досліджень українські науковці займають вагомі позиції, водночас у сфері практичного впровадження нанотехнологій й розвитку nanoіндустріальних виробництв наша країна відстає від лідерів на десятки років.

Основна сфера використання нанотехнологій – теоретично обґрунтовані експериментальні дослідження в галузі синтезу, аналізу, виробництва й застосування продуктів з визначеною структурою за допомогою спрямованого маніпулювання на рівні атомних і молекулярних взаємодій. Нанотехнології перебувають на передньому краю різноманітних наукових, економічних та соціальних напрямів розвитку науково-технічного прогресу. Їх застосовують у медицині, електроніці й екології. Інноваційні розробки на рівні атомів і молекул – дійсно великий крок у майбутнє науки, зокрема медицини, біології, ветеринарії.

## 2. НАНОБІОЛОГІЯ ТА НАНОБІОТЕХНОЛОГІЯ

Розвиток нанотехнології дав початок новим галузям наук, однією з яких є нанобіологія, яка присвячена вивченню структурних змін, біологічних і біофізичних процесів у природних біологічних об'єктах чи їх нанобіологічних аналогах. Пізнання законів, яким підпорядковані біологічні системи, створення на цій основі дієвих наномоделей біологічних структур, сьогодні формують основу нанобіології. Досягнення нанобіології дають основу розвитку таких напрямів нанонауки, як біоорганічна нанохімія, нанофармація, наносенсорика тощо. Біологи побачили в нанотехнології можливий якісний прорив у розвитку науки, що дозволяє працювати з речовиною в нанометрових масштабах, оскільки ці розміри характерні для основних біологічних структур – клітин і молекул.

Використання останніх досягнень нанотехнологій в біології призвело до появи нового напрямку – **нанобіотехнології**.

**Нанобіотехнології** – розділ в нанотехнологіях, присвячений вивченню впливу наночастинок на живі системи, а також розробці способів моделювання та практичного застосування біологічних наноструктур, наноявищ і нанопроцесів в експериментальній біології, медицині, екології, сільському господарстві та інших галузях економіки.

До біологічних наноструктур можна віднести, наприклад, молекули білків, розміри яких варіюють в межах від 4 до 50 нм. Розміри будівельних блоків білків – амінокислот – складають близько 1 нм. Молекула ДНК, що має діаметр 1-2 нм, безсумнівно, є наноструктурою, незважаючи на те, що її довжина досягає декількох міліметрів.

З живих організмів до наносвіту можна віднести тільки неклітинні форми життя – віруси. Розміри останніх коливаються в межах 10-200 нм.

У технологіях створення наночастинок існує два принципово різних підходи до обробки речовини:

- «зверху вниз», тобто зменшення розмірів фізичних тіл механічною або іншою обробкою до об'єктів з нанометровими розмірами;
- «знизу вверх», тобто збірка створюваного більшого нанооб'єкту з елементів «нижчого порядку» (атомів, молекул, структурних фрагментів біологічних клітин і т.п.).



Процеси, в які втягуються наноструктури (наночастинки) отримали назву **нанопроцесів**.

Найголовнішим нанопроцесом в живому організмі є біосинтез білка.

Явища живої природи, що протікають за участю наноструктур названі **наноявищами**. Дивно, але самоочищення листя лотоса, який на Сході вважається символом чистоти, можна віднести до наноявищ. Листя лотоса покриті мікрогорбиками висотою 5-10 мкм, від яких відростають нановолоски. Завдяки останнім, краплі дощу не розтікаються, а скочуються по поверхні листка, захоплюючи за собою частки бруду і очищаючи листя лотоса.

Набагато більш давнім наноявищем можна розглядати самовідтворення (аутореplikацію) ДНК. Це надзвичайно складне явище характеризувало вже перших прокариотів Землі – бактерій, що виникли близько 3,5 млрд років тому.

### **3. ОСНОВНІ НАПРЯМКИ РОЗВИТКУ НАНОБІОТЕХНОЛОГІЙ**

**Основні напрямки розвитку нанобіотехнологій можна об'єднати в три групи:**

- моделювання і відтворення наноявищ і наномеханізмів живих систем в лабораторних і виробничих умовах;
- отримання наночастинок і наноматеріалів за участю живих організмів;
- використання наноструктур і нанопроцесів для вторгнення в живий організм з метою його дослідження, діагностики стану і лікування.

**Конкретними завданнями нанобіотехнологій в даний час вважаються:**

- рішення фундаментальних біологічних проблем, невирішених за допомогою традиційних цитологічних і цитохімічних методик (моделювання біологічних процесів, аналіз поведінки біомолекул і атомно-молекулярних комплексів живих клітин, моніторинг життєдіяльності окремих клітин);

- вивчення взаємодії наночастинок з молекулами ДНК з метою розробки нових методів генетичної інженерії;
- вивчення механізмів транспорту речовин через біологічні мембрани із застосуванням наночастинок і створення нанотехнологій спрямованої доставки ліків;
- розробка біосенсорних систем для біології та медицини з метою виявлення певної речовини в навколишньому середовищі або організмі людини, а також для виявлення мутацій;
- вивчення можливостей застосування наночастинок в якості нових наноматеріалів медичного призначення: сорбенти для виведення з організму або видалення з його поверхні небажаних і токсичних сполук (продукти метаболізму, важкі метали, радіонукліди, ксенобіотики);
- створення нових високочутливих і зручних в застосуванні систем для діагностики та ефективного лікування захворювань на самих ранніх стадіях розвитку;
- розробка та створення на основі нанобіочастинок нанотехнологій і наноматеріалів для виділення білків, їх модифікації та подальшого виробництва білкових препаратів;
- розробка самовідтворюваних систем на основі біоаналогів – бактерій, вірусів, найпростіших тварин;
- вивчення впливу наночастинок на складноорганізовані біологічні системи, включаючи організми тварин і людини;
- розробка на основі нанобіотехнологій лікувальних препаратів нового покоління;
- створення біологічно сумісних (невідторгнутих організмом) медичних матеріалів для пересадки в живий організм;
- розробка нанороботів, здатних усувати виникаючі в органах вогнища ураження, і не провокують імунні реакції.

## 4. РОЗВИТОК НАНОТЕХНОЛОГІЙ В УКРАЇНІ

У Національній академії наук (НАН) України сформовано комплексну програму фундаментальних досліджень «Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології», у межах якої здійснюють дослідження з фізики металів і сплавів, хімії поверхні, порошкових технологій, мікроелектроніки, колоїдних нанорозчинів, сорбентів, лікарських засобів, в основу яких покладено нанотехнології.

Сьогодні в багатьох науково-дослідних установах не тільки синтезують наночастинки, а й проводять дослідження з визначення механізмів їхньої дії, біологічних ефектів, зокрема стимулювання фізіолого-біохімічних процесів у клітинах організму, а також біобезпечності та токсичності.

Так, в «Інституті монокристалів» НАН України розроблено наноматеріали, які можна застосовувати в медичній практиці та фармації. Інститут хімії поверхні імені О.О. Чуйка НАН України спільно з вітчизняними науково-медичними закладами вперше у світі розробив, дослідив та впровадив у медичну практику новий препарат сорбційнодезінтоксикаційної дії на основі нанокремнезему «Силікс». На кафедрі фармакології та клінічної фармації Національного медичного університету імені О.О. Богомольця розроблено нову лікарську форму – суспензію на основі нанодисперсного кремнезему. Вона мінімізує токсичність і негативний вплив на функцію печінки таких сполук, як фторид і нітрит натрію, а також протитуберкульозних препаратів – ізоніазиду, піразинаміду, етамбутолу, що різняться механізмом негативного впливу на організм і хімічною структурою. За фармакологічною активністю суспензія нанодисперсного кремнезему перевищує препарати звичайного кремнезему.

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького спільно з Інститутом електрозварювання імені Є.О. Патона розробляє нові варіанти колоїдних систем з магнітними наночастинками  $Fe_3O_4$  з метою створення протипухлинних препаратів. У співпраці Інституту електрозварювання імені Є.О. Патона та Національного медичного університету імені О.О. Богомольця встановлено, що наночастинки Аргентуму та Купруму проявляють більш виражену протимікробну дію стосовно *Staphylococcus aureus*, ніж звичайні препарати цих металів.

Наночастинки починають застосовувати у галузі біофізики, молекулярної біології, протеоміки, генетики, зокрема для створення біомаркерів. Магнітні наночастинки, на які нанесено антитіла та фрагменти ДНК, мають властивість посилювати сигнал із численних маленьких біомолекул. Це дозволить діагностувати хворобу на ранніх стадіях й ефективніше лікувати різні захворювання. Водночас синтез наночастинок, які мають властивості ад'ювантів, та їх з'єднання з антигеном (вірусом, бактерією чи їх фрагментами) дає можливість створювати вакцини нового покоління. Так, в галузі ветеринарної медицини безліч наночастинок використовують з метою виявлення вірусних, паразитарних та бактеріальних патогенів.

Проведені в Інститут біології тварин (ІБТ) НААН дослідження показали ефективність використання нових полімерних носіїв на основі диметиламіноетилметакрилату (поліДМАЕМ) для транспортування антисенс-олігодезоксинуклеотидів (асОДН) у клітини ссавців. Встановлено, що поліДМАЕМ у концентрації менш, ніж 5 мкг/мл не чинить цитотоксичного впливу на культуру клітин ембріональних фібробластів лінії L1210 мишей. Результати дослідження впливу поліДМАЕМ та його комплексів із асОДН на рівень експресії фізіологічного пріона (PrP<sup>C</sup>) у клітинах лінії L1210 свідчать про зниження вмісту PrP<sup>C</sup> на 70-90%. Доведена можливість успішного застосування кон'югатів асОДН та носія для практично повного пригнічення експресії фізіологічного пріона у селезінці, тонкій кишці і, що найважливіше, мозку тварин. Таким чином, перспективним є те, що наносполуки здатні долати гематоенцефалічний бар'єр і впливати на патологічний процес у мозку.

Досягнення нанотехнології в розробленні вакцин полягають у використанні нових ад'ювантів на основі наночастинок, до яких кріпляться безпечні антигени, що утворюються з синтетичних пептидів і рекомбінантних білків. Такі вакцини матимуть значно більший ефект, не чинитимуть побічних дій та будуть безпечними при застосуванні.

Проведені в ІБТ НААН дослідження показали, що новий тип нанополімерів на основі псевдоамінокислот поліестерного типу не є шкідливими для організму і вони можуть бути використані як ад'юванти в процесі створення вакцин.

У характеристиці наноматеріалів особливо важливими є розчинність, розмір частинок, а також проникність через біологічні мембрани.

Ці властивості можуть бути взаємопов'язані, що вимагає поєднання різних наукових напрямів і підходів у їх дослідженні. Так, розчинність нанорозмірної речовини буде впливати на вибір складу препарату та аналітичного методу дослідження. Розмір частинок також повинен бути оптимальним, оскільки зменшення величини частинок має свої межі не тільки з точки зору технології, але й з точки зору біодоступності та безпеки. Не можна вважати виправданим бажання отримати якомога менший розмір частинок речовини, оскільки зменшення розміру частинок може викликати інактивацію речовини, швидке виведення з організму або прояв небажаної дії на організм.

Одна з важливих властивостей наночастинок – здатність виступати переносником фізіологічно активних речовин, ксенобіотиків та лікарських засобів у клітинимішені як основи розвитку патологічного процесу. В ролі наночастинок, які стають своєрідними «кур'єрами» або «контейнерами», можуть бути використані наночіпи – фосфоліпідні частинки, ліпосоми, фулерени, дендримери, хітозан, нанотрубки та інші. Наноструктуризація призводить до зменшення розміру лікарської форми і підвищення вмісту активної речовини у крові. Є два напрями адресної доставки ліків: пасивний направлений транспорт (полегшене подолання природних бар'єрів) та специфічна доставка (впізнавання патологічної тканини). Так, українськими дослідниками доведена можливість трансмембранного транспортування нанорозмірних комплексів і частинок у клітини бактерій, що здатні до вибіркового акумулювання колоїдних частинок Ауруму, а також визначено молекулярні структури і механізми, відповідальні за цей процес.

З цього напрямку досліджень розроблені нові методи і засоби на нанометровому рівні, які починають застосовуватися у медико-біологічній практиці. Зокрема прицільна протипухлинна терапія за щоденного клінічного використання має такі переваги: надає можливість молекулярного відображення найменших проявів дії наночастинок на клітинному рівні; формує ефективний механізм молекулярного прицілювання після ідентифікації певних клітинних маркерів; дозволяє застосовувати технологію знищення клітин, ідентифікованих як злоякісні, а також технологію моніторингу одержаного ефекту. Сучасний стан розвитку нанотехнологій дозволяє усувати дефекти в організмі хворої людини чи тварин

способом керованих нанохірургічних втручань, створювати прилади для контролю рівня глюкози у крові та для виробництва інсуліну. Методами молекулярного моделювання продемонстровано можливість створення на порядок складніших систем, зокрема штучних еритроцитів.

Упровадження нанотехнологічних підходів у практику дозволяє здійснювати ранню діагностику захворювань, виявляти онкологічні, ендокринні, серцево-судинні захворювання, вірусні та бактеріальні інфекції, а також покращити ефективність діагностики, яке базується на передачі візуальної інформації про найдрібніші структури – молекулярної фізіографії. Так, наночастинки Ауруму разом з антитілами можуть знизити шкідливий ефект від опромінення при лікуванні пухлин.

Нанодіагностика *in vitro* розвивається у двох напрямках: використання наночастинок як маркерів біологічних молекул і застосування інноваційних нанотехнологічних способів вимірювання. Зокрема сенсорні системи, які вже зараз використовуються в біології, суттєво спрощують діагностику захворювань та дозволяють простежувати взаємодію між протеїнами і ДНК в режимі реального часу. Оскільки в наш час стало принципово важливим «зчитування» генетичної інформації, за досить короткий час будуть створені та вдосконалені так звані ДНК-чіпи, які дозволять високовірогідно здійснювати аналіз генетичної інформації людини чи тварин і проводити лікувальний курс, який відповідає генетичному типу конкретної особини. Це зразу дозволить поставити завдання створення індивідуальних ліків. Завдяки нанотехнологіям отримала розвиток тканинна імплантація у зв'язку з використанням інноваційних засобів відновлення чи заміщення органів і тканин. Зокрема нанокристалічна структура поверхні імплантата прискорює процес остеогенезу і включення штучного матеріалу в природну кісткову тканину. Іншим методом є нанокристалічне алмазне покриття, яке також обіцяє значно подовжити функціонування і стабільність імплантатів.

Почав розвиватися напрямок дослідження біоматеріалів – нановолокон, котрі вчені хочуть використати для створення штучних тканин (у перспективі – органів) на основі клітинних технологій. Визначають також інші пріоритетні напрями розвитку нанобіотехнології та отримання наноматеріалів:



- супершвидкісні молекулярні детектори для визначення первинної структури генома на основі неорганічних нанопор;
- геноми, що саморозмножуються і застосовуються з метою виробництва ліків, проведення фармакологічного скрінінгу та моделювання патологічних процесів;
- біосумісні наноматеріали широкого спектру застосування для створення принципово нових типів перев'язувальних матеріалів і штучних органів.

Розроблена методика відтворення хрящової тканини, що має механічні та біохімічні властивості, близькі до природного хряща, і використовується для відновлення фізичних властивостей зубної емалі; створюються технології обробки поверхонь методом наноапилення з метою надання їм антибактеріальних властивостей.

Наночастинки Аргентуму проявляють антивірусні, антибактеріальні та ранозагоювальні ефекти. Нанодезінфектанти на основі наночастинок Аргентуму мають широкий спектр біоцидної і антивірусної активності та значно вищу токсичність стосовно мікробів, вірусів і грибків, зокрема до штамів, не сприйнятливих до традиційних антибіотиків, дезінфектантів та антисептиків. Наприклад, папір з нанесеними на нього наночастинками Аргентуму має згубні властивості для таких бактерій, як кишкова паличка. Завдяки новітнім технологіям отримання та нанесення наночастинок можна досягти рівномірнішого їх розподілу по поверхні паперу та уникнути утворення агломератів, що призводить до збільшення ефективної поверхні Аргентуму за зовсім невеликої витрати металу. Нанесення наночастинок цього елемента на сульфаніламід (стрептоцид), який сам по собі має широкий спектр протимікробної дії, модифікує наявний лікарський засіб та призводить до таких позитивних ефектів, як пролонгація та локалізація дії.

В ІБТ НААН проведені комплексні дослідження стосовно впливу застосування функціоналізованих наночастинок Аргентуму в репродуктивній біотехнології, зокрема при дозріванні ооцитів, зберіганні спермій та розвитку ембріонів за умов *in vitro*, а також при заплідненні та ранньому ембріональному розвитку кролів *in vivo*. Отримані дані мають важливе значення для створення лікарських препаратів на основі наночастинок

Ag з подальшим їх використанням у лікуванні інфекційних хвороб, зокрема пов'язаних з репродуктивною системою.

Сьогодні також проведені широкомасштабні дослідження з вивчення біологічної дії нанопорошків Феруму. Було досліджено вплив наночастинок Феруму на організм мишей, щурів, великої рогатої худоби, птахів, риб і деякі рослинні об'єкти. Встановлено, що гостре пероральне введення їх суспензії мишам в дозі 50, 100 і 500 мкг/кг не викликало жодних токсичних ефектів. Водночас введення доз 1000, 2000 і 5000 мкг/кг призводило до розвитку запального процесу на слизовій оболонці шлунка та кишечника, а також порушення гемоцитопоезу. На основі отриманих результатів механізм токсичної дії наночастинок Феруму автори пов'язують зі стимуляцією оксидативного стресу, порушенням функцій мітохондрій і збільшенням проникності мембран клітин.

Іншими авторами доведено, що однократне введення наночастинок ферум оксиду ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) у концентрації 100 мкг/мл стимулювало дихальну функцію крові, змінювало геометричний профіль еритроцитів, індукувало конформаційну перебудову гемоглобіну. Слабка токсичність, біосумісність і магнітні властивості Феруму дозволили створити на основі  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  маркер для онкодіагностики, стабілізований декстраном і натрію цитратом.

Останнім часом доведено, що зменшення розміру частинок призводить до якісних змін їх магнітних властивостей, що є основою однодомного стану та суперпарамагнетизму. Відомо, що наночастинки на основі оксигідроксидів Феруму у вигляді феритину утворюються в організмі. Доведено також біологічну безпечність штучно створених наночастинок ферум оксиду. Це дало підставу саме на основі названих магнітних наноматеріалів провести дослідження і рекомендувати розробки для застосування у біології та медицині.

Спроби створити наноматеріали з кращими магнітними властивостями, ніж у наночастинок ферум оксиду, призвели до синтезу композитних наночастинок, зокрема  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ . Зазначені наночастинки перевершили наночастинки ферум оксиду в ролі контрастних агентів для магнітно-резонансної томографії за проведених досліджень *in vivo*. Композити наночастинок ферум оксиду із приєднаними атомами тербію не були цитотоксичними, а крім магнітних, демонстрували також флуоресцентні властивості.

Окрім діагностичних застосувань, композитні нанокристали на основі Феруму можуть використовуватися і для лікування злоякісних новоутворень.

Однак майбутнє нанобіотехнологій не за наночастинками, а за функціональними нанобіоматеріалами, в яких наявність вільних (незв'язаних) наночастинок зведена до мінімуму, а найкраще – до нуля. З цієї причини перспективними нанопродуктами є функціональні нанобіоматеріали у вигляді наноаквахелатів різних металів, які проявляють високу біологічну активність і не є токсичними. Завдяки розробці ерозійно-вибухових нанотехнологій отримані нові наноматеріали. Зокрема, за методом Косінова Каплуненка отримані колоїдні розчини наночастинок металів; аквахелати та гідратовані наночастинки біогенних металів; електрично нейтральні і електрично заряджені металеві наночастинки макро-мікроелементів в аморфному стані.

За умов *in vitro* проведено оцінку біологічної активності цитратів металів (Fe, Cu, Zn, Mg), отриманих ерозійно-вибуховою нанотехнологією, з розміром частинок не більше 200 нм. Досліджено їхній вплив на культури клітин людини HepG2 (гепатокарцинома), A549 (недрібноклітинний рак легень), HaCat (нормальні кератиноцити) та на білки сироватки крові людини (альбуміни, імуноглобуліни). Встановлено, що найбільшу цитотоксичну активність стосовно культури клітин проявляли наночастинки Купруму та Цинку, найменшу – Магнію. Найбільша денатуруюча активність стосовно білків плазми крові людини визначена для наночастинок Феруму, а найменша – для Магнію. Отримані результати досліджень вказують на те, що цитотоксична та денатуруюча активність одного й того ж металу була різною, що може вказувати на різні мішені їхньої токсичної дії.

В ІБТ НААН виконуються комплексні дослідження щодо з'ясування фізіолого-біохімічних механізмів дії наноаквацитратів есенціальних мікроелементів в організмі лабораторних і сільськогосподарських тварин у різні періоди онтогенетичного розвитку та продуктивного використання. Розробляються і створюються біоактивні кормові добавки на основі нанокомпонентів у вигляді наноаквацитратів металів, що проявляють високу біологічну активність і не є токсичними.

Дослідженнями встановлено, що наноаквацитрати мінеральних елементів є біологічно ефективними і безпечними для здоров'я та дозволені для збагачення кормів, сировини і харчових продуктів. Так, за використання цитратів Cr, Se та Ge для підгодівлі бджіл виявили зниження вмісту важких металів (Cd, Pb) як у тканинах цілого організму, так і окремих анатомічних відділах бджіл. Виявлено позитивні зміни динаміки вмісту окремих фракцій ліпідів, що сприяють процесам метаболічного нагромадження енергетичних і пластичних компонентів трофічного ланцюга та підтверджують доцільність використання цитратних добавок у підгодівлі бджіл.

Отже, нанотехнології є мультидисциплінарним напрямом фундаментальної та прикладної науки з широким спектром різноманітних засобів та інструментів на стику біології, фізики, хімії та інженерії. Нанотехнології є одним з найважливіших напрямів у біологічній науці, гуманній і ветеринарній медицині, сучасному сільському господарстві, а також харчовій промисловості, що може стати рушійною економічною силою в найближчому майбутньому.

### **КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ**

1. Що таке нанонаука, нанобіотехнологія?
2. Назвіть основні напрямки нанонауки.
3. Пригадайте історію виникення нанотехнологій.
4. Які основні види синтетичних наноматеріалів ви знаєте?
5. Які переваги нанопрепаратів, що розробляються в наномедицині перед традиційними?
6. Назвіть основні напрямки розвитку нанобіотехнологій.
7. Опишіть розвиток нанобіотехнологій в Україні.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Біотехнологія: підручник / ред. В.Г., Герасименко. Київ: Інкос, 2006.
2. Влізло В.В., Іскра Р.Я., Федорук Р.С. Нанобіотехнології. сучасність та перспективи розвитку. *Біологія тварин*. 2015. Вип. 7 (4). С. 18-29.
3. Каратєєва О.І., Юлевич О.І. Загальна біотехнологія: курс лекцій. Миколаїв: МНАУ, 2022.
4. Молекулярна генетика та технології дослідження геному: навч. посіб. / ред. М.І. Гиль. Миколаїв: МНАУ, 2014.
5. Пляцук Л.Д. Екологічна біотехнологія: принципи створення біотехнологічних виробництв: навчальний посібник. Суми: Сумський державний університет, 2018.
6. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія: підручник. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008.

Міністерство освіти і науки України  
Кам'янець-Подільський національний університет імені Івана Огієнка

НАВЧАЛЬНЕ ЕЛЕКТРОННЕ ВИДАННЯ

**ГРИГОРЧУК Інна Дмитрівна,**  
кандидат біологічних наук, доцент кафедри  
біології та екології Кам'янець-Подільського  
національного університету імені Івана Огієнка

**ОПТАСЮК Ольга Михайлівна,**  
кандидат біологічних наук, доцент кафедри  
біології та екології Кам'янець-Подільського  
національного університету імені Івана Огієнка

**БІОТЕХНОЛОГІЯ З ОСНОВАМИ  
НАНОТЕХНОЛОГІЇ**  
*КУРС ЛЕКЦІЙ*

**НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК**

**ЕЛЕКТРОННЕ ВИДАННЯ**

Підписано 26.03.2024. Формат 60x84/16. Гарнітура «Cambria».  
Об'єм даних 2 Мб. Обл.-вид. арк. 6,9. Зам. № 1096.

Кам'янець-Подільський національний університет  
імені Івана Огієнка,  
вул. Огієнка, 61, м. Кам'янець-Подільський, 32300.  
Свідоцтво серії ДК № 3382 від 05.02.2009 р.

Виготовлено в Кам'янець-Подільському національному  
університеті імені Івана Огієнка,  
вул. Огієнка, 61, м. Кам'янець-Подільський, 32300.