МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский
технический университет имени К. И. Сатпаева

Г. А. Джамалова, У. Ш. Мусина, Б. К. Еликбаев

# ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

**(для технических вузов)**

Рекомендовано Научно-методическим советом
университета в качестве учебного пособия

Алматы 2015

УДК 60(075.8)
ББК 30.16 я73
Д 40 0

Рецензенты:
*Казова Р. А.*, д-р хим. наук, проф. КазНИТУ имени К. И. Сатпаева;
*Кентбаев Е. Ж.*, д-р сельск. наук, проф., зав. каф. «Лесныересурсы и охотоведение» КазНАУ;
*Канаев А. Т.*, д-р биол. наук, проф., зав. каф. биоразнообразия и биоресурсов КазНУ имени аль-Фараби, акад. РАЕ, чл.-корр. Межд. акад. «Конкор» (Франция);
*Мирзадинов Р. А.*, д-р биол. наук, проф. КазАТК имени М.Тынышбаева.

Джамалова Г. А., Мусина У. Ш., Еликбаев Б. К.
Основы биотехнологии: Учеб. пособие для технических высших учебных заведений / Г. А. Джамалова, У. Ш. Мусина, Б. К. Еликбаев. – Алматы: КазНИТУ, 2015. – 340 с. Ил. 106. Табл. 80. Библиогр. – 237 назв.
ISBN 978-601-228-825-4

*Учебное пособие состоит из 2-х частей. Первая часть посвящена фундаментально-прикладным основам биотехнологии, охватывающей направления развития: сферы науки и производства, также рассмотрены методы биотехнологии. Материал изложен в последовательности от молекулярной и клеточной до промышленной биотехнологии и производства биологически активных веществ. Вторая часть посвящена основам прикладной биотехнологии, где особое внимание уделено промышленной биотехнологии, экобиотехнологии, актуальность изучения которого предопределена необходимостью решения рационального использования природных ресурсов и экологических проблем промышленности Казахстана.*

*Учебное пособие предназначено для студентов, магистрантов, докторантов и преподавателей, а также для научных работников и специалистов, занимающихся разработкой экологизированных технологий и техники на основе биотехнологии.*

# ВВЕДЕНИЕ

Быстрые темпы развития современной биологической науки обусловливаются запросами здравоохранения, сельского хозяйства, промышленности и, безусловно, познания человека.

Достижения биологии XX в. относятся к событиям исторического значения. Благодаря технологии рекомбинантного ДНК человечество получило позитивные сдвиги в области генетических исследований. Благодаря расшифровке генетического аппарата стало возможным не только получение синтетических генов, но и её реализация на макроуровне путем производства метаболитов как технического, так и терапевтического назначения.

В растениеводстве и животноводстве проводятся уникальные исследования по конструированию генотипов с целью получения информации по биологии их развития и создания таких популяций, которым были бы свойственны высокая продуктивность, высокие показатели воспроизводства и хорошая резистентность.

В различных отраслях промышленности биотехнология не только прочно укрепилась, но и перспективна для развития отрасли, в частности, в горнодобывающей промышленности – для рационального использования угольных ресурсов, в энергетике – для производства возобновляемой энергии, в нефтяной промышленности – в повышении нефтеотдачи, в металлургии – в биовыщелачивании металлов, в машиностроении и приборостроении – в обеспечении биостойкости материалов, используемых для их конструирования.

В предлагаемом учебном пособии раскрываются основы биотехнологии для технических вузов.

Цель пособия – иллюстрация принципов и интерпретация основных методологических приемов, направленных на конструирование желательных генов и генотипов *in vitro* (*биотехнология как сфера науки*), на производство метаболитов (*биотехнология как сфера производства*), на защиту окружающей среды (*биотехнология, как сфера «зеленої» защиты окружающей среды*).

Учебное пособие состоит из 2-х частей.

*Первая часть* раскрывает иерархию биотехнологических наук и производств и включает основы фундаментальной и прикладной биотехнологии.

В *первой главе* дано общее представление о науке «Биотехнология», раскрываются основные методы и направления развития науки, прослеживается история развития науки и ее связь с другими науками, а также дается объяснение тому, как экономика является движущим рычагом в развитии биотехнологии.

*Главы 2–5*, раскрывающие фундаментально-прикладные основы биотехнологии, предусматривают изложение основ молекулярной биотехнологии при конструировании генов и генотипов *in vitro* (глава 2), основ клеточной биотехнологии на базе культивирования генотипов (глава 3), основ масштабирования биотехнологического процесса (основ промышленной биотехнологии (глава 4), основ биотехнологии производства на примере производства «классических» биологически активных веществ, в том числе фармацевтических и пищевых препаратов (глава 5).

*Вторая часть* раскрывает основы методов биотехнологии, используемых в различных отраслях промышленности: раскрываются биопроизводственные и биореконструкционные технологии, внедренные и успешно практикуемые в энергетике, горнодобывающей, нефтедобывающей, горно-металлургической, химической, нефтехимической и др. отраслях промышленности.

*Главы 6–9* посвящены биотехнологии промышленных производств по отраслям (энергетика, металлургия, горнодобывающая и химическая промышленности, строительство).

*Глава 10* посвящена биотехнологии «зеленой» защиты окружающей среды (атмосферы, гидросферы, литосферы).

В связи с тем, что излагаемый материал предназначен для технических вузов, очень кратко рассматриваются вопросы, связанные с фундаментальными основами биотехнологии (основами генно-инженерных конструкций), а также прикладными основами биотехнологии (растений и животных, сельскохозяйственной, медицинской) по использованию технологий, направленных на изменение генетической и биологической программы развития генотипов. Заинтересованные в этих вопросах могут обратиться к классическим источникам по биотехнологии медицинской, сельскохозяйственной и пищевой отраслей.

# I. ИЕРАРХИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ НАУК И ПРОИЗВОДСТВ

## 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ – МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНАЯ НАУКА

### 1.1. Биотехнология: предмет и объекты исследования

Биотехнология – наука, использующая метаболические свойства живых организмов для производства продуктов и процессов различного уровня – структурного, организационного и функционального (рис. 1.1).

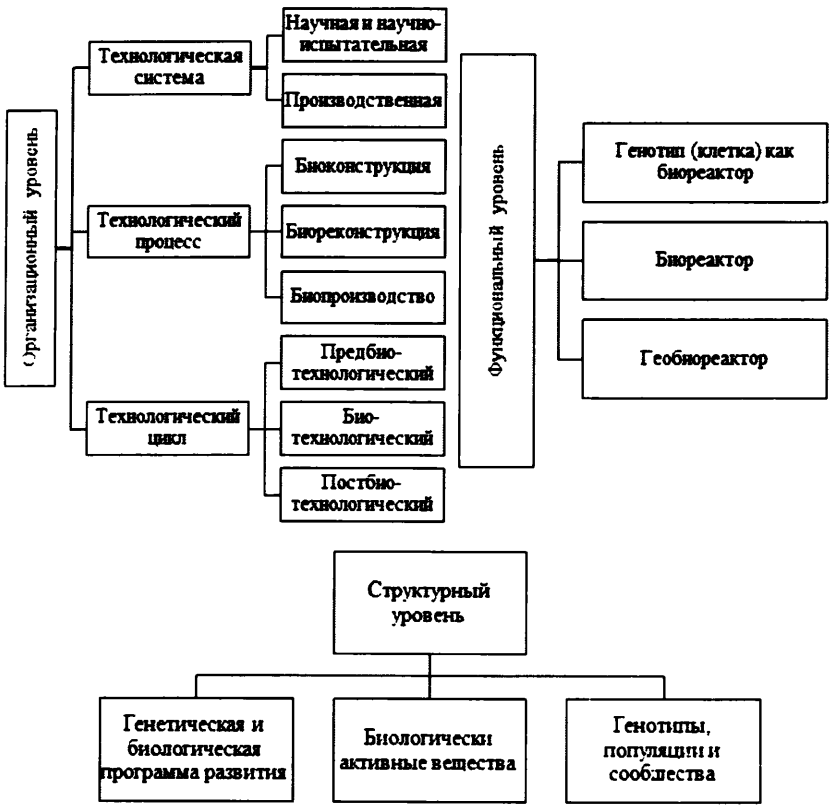



Рис. 1.1. Продукты биотехнологии: уровень организации

Как видно из рис. 1.1, с помощью научных и технических принципов биотехнология в состоянии скорректировать биологическую систему различной сложности организации. При этом биотехнологический процесс по характеру может быть *биоконструкционным* (конструирование генетической и биологической программы развития), *биореконструкционным* (биорегенерационные технологии восстановления на уровне генов, клеток, тканей, органов, организмов и экосистем), *биопроизводственным* (биотехнологии производства молекул, генотипов, популяций и сообществ) и *биоэнергетическим* (биотехнология производства энергии).

Благодаря методам биотехнологии осуществляется устранение наследственных пороков развития и производство биотехнологической продукции путем создания резистентностойких и высокопродуктивных генотипов (штаммов микроорганизмов, сортов растений и пород животных).

Под резистентностью понимают устойчивость генотипов к инфекциям и неблагоприятным факторам.

*Объектами* для исследования в биотехнологии являются представители основных групп живых организмов – вирусы (неклеточные облигатные паразиты), прокариоты (безъядерные одноклеточные эубактерии и архебактерии) и эукариоты (ядерные одноклеточные и многоклеточные организмы), а также изолированные из них молекулы, клетки и субклеточные компоненты и протекающие в них физико-химические, биохимические и физиологические процессы.

*Задачи*, стоящие перед биотехнологией:

1. Методологическая, направленная на расширение и углубление масштабов воздействия научно-технического прогресса на различные уровни организации экосистем.

2. Научная, основанная на разработке генетических и клеточных рекомбинаций *in vitro* (от лат. *«в стекле»*; конструирование генов и генотипов) и направленная на раскрытие молекулярно-клеточных механизмов, происходящих в живом организме.

3. Производственная, базирующаяся на создании биотехнологической индустрии и направленная на получение продукции в области промышленности и производства продовольствия.

## 1.2. Направления развития и методы биотехнологии

В настоящее время передовые идеи в биотехнологии находятся в прямой зависимости от прогресса фундаментальных исследований и от развития биологической техники.

Особенностью для биотехнологии как науки является то, что движущим механизмом в её развитии служат экономические рычаги, которые охватывают сферу производства экономически важных продуктов посредством биологических процессов и объектов.

На рис. 1.2 представлена современная сфера развития биотехнологии.

Как видно из рис. 1.2, современное состояние, проблемы и практические достижения биотехнологии неразрывно связаны с актуальными вопросами человечества.

Сегодня биотехнология координирует научные поиски в решении стратегически важных для человечества вопросов, таких как рост народонаселения, здоровье человека, пищевые ресурсы и охрана окружающей среды, и находит пути для их осуществления.

Приемы и методы биотехнологии влияют на различные сферы научной и производственной деятельности человека, начиная молекулярными и заканчивая космическими исследованиями.

### *1.2.1. Биотехнология: сфера науки*

Биотехнология как сфера науки (фундаментальная биотехнология) развивается по двум основным направлениям – *молекулярному* и *клеточному* (рис.1.2, табл. 1.1). В данном аспекте биотехнология занимается конструированием генетической и биологической программы развития.

Из табл. 1.1 видим, что в зависимости от уровня воздействия на генотип фундаментальная биотехнология на современном этапе затрагивает такие аспекты, как биоинженерия генов, биоинженерия метаболитов, биоинженерия клеток, биоинженерия систем.

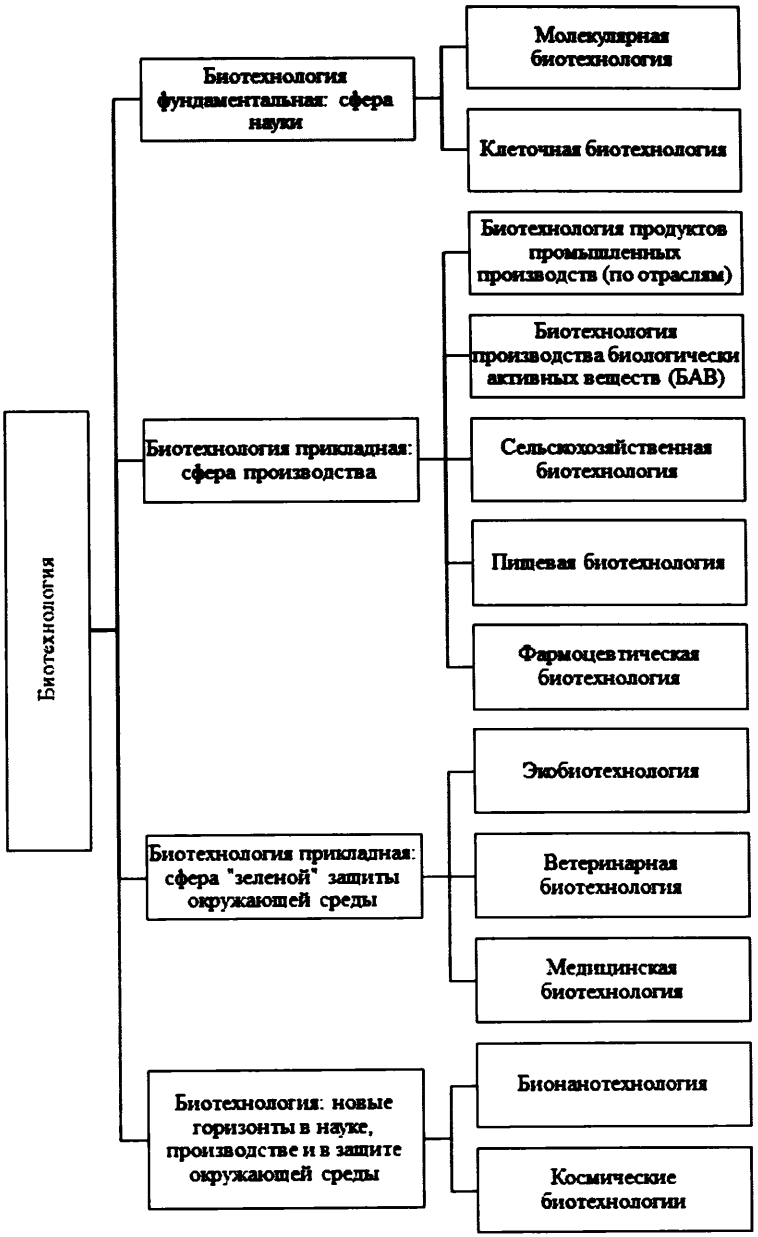



Рис. 1.2. Биотехнология: сфера развития

Таблица 1.1

Направления и методы фундаментальной биотехнологии по уровню воздействия на генотип

| Показатель | Направления по уровню воздействия на генотип | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Молекулярная биотехнология | | Клеточная биотехнология | |
| Методы | Технологии рекомбинантного ДНК | Технологии рекомбинантных метаболитов | Технологии размножения генотипов | Технологии конструирования генотипов |
| Предмет изучения | Информационное содержание и свойства гена (природного происхождения и сконструированного *in vitro*) | Синтез метаболитов в генетически модифицированном генотипе | Функционирование и размножение генотипов (природного происхождения и сконструированного *in vitro*) | Информационное содержание и свойства генома (природного происхождения и сконструированного *in vitro*) |
| Методология | Конструирование и модификация чужеродного гена (чДНК), вектора (вДНК) и рекомбинантного ДНК (рДНК) | Амплификация и клонирование гена. Трансгеноз. Генная инженерия метаболитов | Культура клеток. Трансплантация. Банк генов и генотипов. Библиотека генома | Конструирование и клонирование генотипа |
| Биотехнологический ресурс | Молекулярный(генетические детерминанты) | Клеточный (первичные и вторичные метаболиты) | Клеточный (культура клеток, трансплантат) | Популяционный (клонированные, химерные и трансгенные генотипы) |

**Молекулярная биотехнология** – направление биотехнологии, изучающая информационное содержание гена (генома) и принципы его функционирования для разработки новых генетических программ развития.

В течение предшествующих нашему веку двух столетий проводились научные исследования по изучению и раскрытию биологической сущности нуклеиновых кислот и белков с прогрессивно увеличивающимся интересом и все более глубоким пониманием перспектив, направленных на раскрытие генетической потенции живых организмов.

Сознательная инновационная конструкция генов и белков *in vitro* уже сегодня породила множество коммерческих изобретений – от получения бактериальных белков в промышленности до генной терапии в медицине.

Существует множество противоречивых мнений относительно того, куда движется молекулярная биотехнология и к чему она может привести, но и эксперты и критики соглашаются в одном – данная наука уже необратимо и глубоко влияет на нашу жизнь.

Как указано в табл. 1.1 в молекулярной биотехнологии условно можно выделить два раздела – это биотехнология рекомбинантного ДНК (рДНК) и биотехнология рекомбинантного белка (рБелок).

Под *биотехнологией рекомбинантного ДНК* (генная инженерия, биоинженерия генов) подразумевают биоконструкторские технологии, направленные на получение чужеродного гена (чДНК), векторногоДНК (вДНК) и рекомбинантного ДНК (рДНК) с применением методов инженерной энзимологии.

*Чужеродная ДНК* (чДНК) – это искусственно созданный или выделенный из генома структурный или регуляторный ген. Ген, кодирующий полипептидную цепь или РНК, называется *структурным*, а регулирующий работу структурного гена – *регуляторным* [28, 70, 97, 124].

*Векторная ДНК* (вДНК) – это сконструированная ДНК-молекула чаще вирусного или плазмидного происхождения, предназначенная для интеграции чужеродного гена в геном реципиента. В данном случае *реципиент* – это организм, получивший сконструированную *in vitro* генетическую конструкцию

(чужеродный ген, рекомбинантную ДНК) [28, 70, 97, 124].

*Рекомбинантная ДНК* (рДНК) – это искусственно созданная кольцевая химерная молекула ДНК. В составе рДНК содержатся ДНК различного происхождения – вирусов и/или прокариот и эукариот: рДНК = чДНК + вДНК. Следовательно, рДНК – это сконструированная *in vitro* химерная кольцевая ДНК [28, 70, 97, 124].

Данная область сформировалась как новое научное направление благодаря применению обширного набора методов микроскопической техники, в результате которого стало возможным не только конструкция жизненно важных молекул *in vitro*, но и их реализация *in vivo* на уровне метаболического продукта. Такие конструкторские разработки позволяют в настоящее время создавать молекулы как с промышленным, так и терапевтическим назначением.

*Биотехнология рекомбинантного белка* (биоинженерия, инженерия белка) – наука, основанная на конструировании биохимических процессов клетки для производства белков, обладающих терапевтическими или другими полезными свойствами с последующим использованием их соответственно в медицине и других сферах биотехнологической индустрии.

На сегодня инженерия белка является одной из наиболее зрелых областей нанобиотехнологии, поскольку мы действительно знаем, как воссоздать нужное количество белков или сконструировать их *in vitro*.

Технологии на молекулярном уровне основаны на применении ключевых свойств генетического аппарата [26, 60, 85], таких как:

– *репликация* – удвоение генетического аппарата), *репарация* (исправление ошибок в ДНК при репликации,

– *рестрикция-модификация* – система защиты генома от ДНК-*«агрессора»*,

– *экспрессия* – синтез первичных метаболитов: преобразование гена в функциональный продукт – РНК, белок.

На рис. 1.3 показан научный потенциал молекулярной биотехнологии.

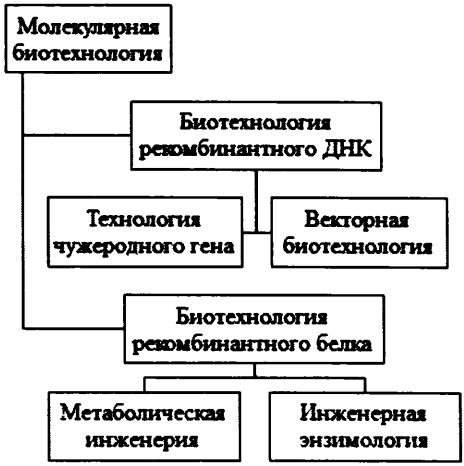



Рис. 1.3. Научный потенциал молекулярной биотехнологии

Как следует из рис. 1.3, с целью создания новых генетических программ развития молекулярная биотехнология:

– использует природные генетические ресурсы для получения первичных метаболитов биотехнологической природы – это чужеродные (технология чужеродного гена), векторные (технология векторной ДНК), рекомбинантные ДНК (биотехнология рекомбинантного ДНК), химерные и рекомбинантные белки (метаболическая инженерия, инженерная энзимология);

– осуществляет реорганизацию генома для переориентации путей биосинтеза в нужном направлении (метаболическая инженерия, инженерная энзимология).

**Клеточная биотехнология** – направление биотехнологии, разрабатывающая на основе биоконструкторских технологий новые биологические программы развития.

Методами биотехнологии клетка может быть подвергнута различным молекулярно-генетическим рекомбинациям *in vitro* с сохранением в дальнейшем всех её функциональных особенностей.

Развитие клеточной биотехнологии связано с успехами молекулярной и клеточной биологии, которые открыли неведомые ранее возможности для дальнейшего познания органического мира.

Очевидность огромного значения клеточной биотехноло-

гии для медицины, сельского хозяйства и промышленности, и убежденность в наличии ещё более захватывающих перспектив в раскрытии потенции клетки с целью улучшения здоровья человека, продления жизни и улучшения жизненных условий привели к тому, что уже сегодня клеточную биотехнологию вправе считать наукой, основанной на применении *«утонченных»* технологий.

Предметом изучения для клеточной биотехнологии являются вопросы, раскрывающие принципы функционирования генотипа как на онтогенетическом (клетка→ ткань→ орган→ организм), так и на филогенетическом (популяция) уровнях.

Под онтогенезом понимают индивидуальное развитие индивидуума (генотипа), под филогенезом – развитие биологического вида во времени (популяция как единица эволюционного процесса) [27].

Потенциально данное направление биотехнологии способствует извлечению из организма ресурсов: биохимических (ДНК, РНК, белок; различные сконструированные метаболиты);физиологических (репродукция, регенерация) и селекционных (продуктивность, резистентность).

Биоконструкторские технологии, затрагивающие внутреннюю организацию клетки условно можно отнести к *микротехнологиям*, а не затрагивающие – к *макротехнологиям* (рис. 1.4).

*Макротехнологии* способствуют [20, 38, 96, 110, 121, 128, 195, 196, 232]:

1) при культивировании – получению клеточной биомассы (белок одноклеточных организмов, каллус, эмбрион на определенной стадии развития, ткань для трансплантации и пр.) или метаболитов (первичных, вторичных) в заданной программе;

2) при клеточной селекции – рентабельному использованию ценных генотипов;

3) при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) – получению индивидуумов с заданным полом или получению гибридных клеток и индивидуумов (клеточная гибридизация);

4) при трансплантации клеток, тканей и органов – осуществлению самотической гибридизации в растениеводстве или клеточной терапии в медицине;

5) при трансплантации эмбрионов – искоренению бесплодия в медицине или ускоренному размножению ценных генотипов в животноводстве;

6) при криотехнологиях – созданию банка ценных генов и генотипов и, при необходимости, их экспорту и импорту.




Рис. 1.4. Научный потенциал клеточной биотехнологии

*Микротехнологии* обеспечивают [20, 35, 38, 96, 110, 115, 121, 128, 208]:

1) конструирование *in vitro* ценных генотипов (клонирование, гибридомная технология, технология химерных генотипов, трансгенная технология);

2) биокопирование сконструированных *in vitro* генов и генотипов (клонирование);

3) проведение клеточной и генной терапии (трансгенная

технология).

Как видим, макротехнологии основаны на способности клеток к существованию, размножению и развитию *in vitro*, тогда как микротехнологии – на тотипотентности и на способности клеток к регенерации.

Функциональная сущность клеточных биотехнологий представлена на рис. 1.5.




Рис. 1.5. Функциональная сущность клеточных биотехнологий

Из рис. 1.5 видно, что клеточные биотехнологии направлены на размножение и конструирование генотипов заданной программы.

При этом конструирование генотипа методами биотехнологии возможно при воздействии непосредственно на ДНК, ядро и клетку:

1. Конструирование генотипа на уровне генетических детерминантов.

Данный тип конструирования обеспечивает получение генно-модифицированных (трансгенных) генотипов, т. е. генотипов, в геноме которых экспрессируется чужеродный ген.

2. Конструирование генотипа на уровне ядра.

При ядерных микроманипуляциях проводят перенос ядер, изолированных из одних клеток (клетка донор) и помещенных в

другие (клетка реципиент) с целью получения клонированных генотипов. Клетка с удаленным ядром называется *энуклеированной.*

3. Конструирование генотипа на уровне клетки.

В этом случае микроманипуляции осуществляют на уровне целых клеток с целью получения монозиготных и химерных генотипов (например, на уровне предимплантационных эмбриональных клеток животных – бластомер: в первом случае изолированные бластомеры по отдельности переносят в энуклеированные яйцеклетки, во втором – объединяют бластомеры различных генотипов внутри одного вида).

Особенностью данных технологий является то, что при первой технологии, *трансгенозе* (перенос генетической конструкции из одной в другую биологическую систему), меняется генетическая программа развития, тогда как при второй и третьей – биологическая программа развития. В свою очередь генетическая программа клетки меняется благодаря трансгенозу только при успешной *«адресной»* интеграции рДНК в геном реципиента и её экспрессией. Благодаря данной технологии организм, уже трансгенный (трансгенный генотип, генномодифицированный генотип), приобретает генетически незапрограммированные свойства. Изменение биологической программы означает, прежде всего, изменение биологических принципов развития, что осуществимо только при клонировании (биокопирование генов и генотипов) и химерных технологиях (технологии создания индивидуумов из качественно разнородных генотипов).

Но следует отметить, что в целом, в силу неизученности многих аспектов, микротехнологии являются очень сложными, непредсказуемыми и слабоуправляемыми процессами.

Конечными продуктами для молекулярной биотехнологии являются рекомбинантные ДНК, клеточной – химерные и клонированные гены и генотипы, а в комплексе эти технологии обеспечивают создание трансгенных генотипов.

### *1.2.2. Биотехнология: сфера производства*

В настоящее время биологическая наука, обогащенная достижениями биотехнологии, в силе создать многопрофильную

производственную систему, основанную на функционировании метаболических механизмов живого организма.

На рис. 1.6 показан производственный потенциал биотехнологии.




Рис. 1.6. Производственный потенциал биотехнологии

Как видно из рис. 1.6, биотехнология как сфера производства (прикладная биотехнология) также развивается по двум направлениям – это биотехнология микроорганизмов и биотехнология макроорганизмов. Биотехнологические коммерческие продукты от них получают в процессе регулируемых и подчиненных интересам человека метаболических механизмов.

**Биотехнология микроорганизмов.** Генератором биотехнологического процесса являются микроорганизмы, так как именно на их основе:

1. Создаются биотехнологические детерминанты генетического поведения (чужеродная ДНК, векторная ДНК, рекомбинантная ДНК).

2. Осуществляется клонирование сконструированных *in vitro* рекомбинантных ДНК.

3. Производятся ценные метаболиты (экспрессия чДНК в геноме реципиента).

4. Реорганизуются геномы высших эукариот с целью переориентации путей биосинтеза в нужном направлении (метаболическая инженерия).

Биохимическая *«гибкость»* микроорганизмов предопределило их восхождение на олимп биотехнологической индустрии. Именно благодаря микроорганизмам биотехнология стала продуцировать ценные метаболиты в промышленных масштабах. Биотехнология микроорганизмов является не только *«конструкторским мозгом»* для всех биотехнологических разработок, но и *«технологическим центром»* для производства биопродукта любого назначения. В результате, расширяя сферу своего применения, биотехнология микроорганизмов вкладывает весомый вклад в эволюцию биотехнологического процесса.

**Биотехнология макроорганизмов** развивается по двум направлениям. Первое направление связано с сельскохозяйственной биотехнологией (биотехнология растений, биотехнология животных), второе – со здравоохранением (медицинская биотехнология, в том числе ветеринарная биотехнология).

Центром по производству пищевого сырья является аграрный сектор, в распоряжении которой находятся генетические ресурсы сельскохозяйственных сортов растений и пород животных. Для здравоохранения все фундаментальные биотехнологические разработки направлены на решение таких задач, как обеспечение сохранения здоровья, выявление и искоренение генетических пороков развития, борьба с инфекционными заболеваниями.

Таким образом, генетические ресурсы позволяют от микро- и макроорганизмов получать экономически важные метаболиты на промышленном уровне, в результате сформировалось новое направление в биотехнологии – **промышленная биотехнология**.

Промышленная биотехнология как важная отрасль экономики придерживается основных принципов – научного потенциала, экономической обоснованности, удешевления производства и надежности технологических разработок. Первый принцип означает, что внедрение биотехнологического процесса и его расширение на промышленном уровне осуществляется только после его научного обоснования, второй – традиционные

технологии результативно замещаются биотехнологическими процессами только в случае экономической выгоды, третий – использование естественных биореакторов природного (водоемы для производства биомассы, например, микроводорослей) и техногенного (свалочное тело полигона твердых бытовых отходов, как геобиореактор для производства биогаза) происхождения, четвертый – строгая согласованность между спросом и производством.

На рис. 1.7 показаны сферы применения биотехнологии для получения продуктов промышленных производств (по отраслям).




Рис. 1.7. Биотехнология продуктов промышленных производств (по отраслям)

Как видно из рис. 1.7, биотехнология в промышленности охватывает отрасли: горнодобывающую, металлургическую, машиностроение, нефтедобывающую, нефтеперерабатывающую, химическую, энергетическую, а также другие отрасли: сельское хозяйство, кожевенно-обувную, меховую, пищевую, текстильную, косметическую, фармацевтическую.

В биотехнологии промышленных производств (по отраслям):

1) извлекают медь, золото, уран, редкие и рассеянные металлы и др. из природных и техногенных видов сырья;

2) успешно синтезируют искусственные приправы, этилен, пропилен, бутилен, окисленные углеводороды, органические кислоты, терпены, фенолы, акрилаты, полимеры, ферменты, продукты тонкого органического синтеза, полисахариды и сырьё для текстильной промышленности;

3) получают спирты, жирные кислоты, алифатические углеводороды, метанол, этанол, биогаз и биоводород;

4) улучшают технические характеристики:

– каучука, бетонных, цементных гипсовых растворов, моторных топлив,

– антикоррозийных присадок, смазок для проката чёрных и цветных металлов;

5) производят технический белок и липиды;

6) осуществляют:

– интенсификацию добычи нефти, газа, угля,

– искусственный фотосинтез;

7) осуществляют улучшение технологии переработки кож, производства текстильного сырья (ткани с новыми или улучшенными свойствами), шерсти, бумаги, парфюмерно-косметических изделий, получение биополимеров, искусственных кожи и шерсти и т. д.;

8) производят на основе нанобиотехнологий биосенсоры, биочипы, гибридные бионанотрубки, биотранзисторы, бионанопроводники.

В других отраслях производства, например *в сельском хозяйстве*, биотехнология развивается по трем направлениям:

– биотехнология макроорганизмов (биотехнология растений, биотехнология животных) – направлено на извлечение генетического ресурса путем создания резистентностойких и вы-

сокопродуктивных генотипов;

– биотехнология переработки и хранения сельскохозяйственной продукции – связана с производством продовольствия;

– сельскохозяйственная микробиотехнология – занимается созданием микробиологических (рекомбинантные микроорганизмы, стимулирующие противопаразитарные и селекционные эффекты) и кормовых (биодобавки) препаратов, производством биорациональных пестицидов, бактериальных удобрений, гиббереллинов.

*В области производства продовольствия* производят широкомасштабное выращивание бактерий, водорослей, дрожжей, растений и животных для получения различных метаболитов, переработку и хранение пищевых продуктов.

*В области фармацевтической промышленности* методами биотехнологии производят антибиотики, ферменты, аминокислоты, кровезаменители, алкалоиды, нуклеотиды, иммунорегуляторы, противораковые и противовирусные препараты, вакцины, гормональные препараты (инсулин, гормон роста и др.), моноклональные антитела для диагностики и лечения, пробы ДНК для диагностики.

Методами бионанотехнологий стало возможным производство фармонанопрепаратов с адресной доставкой (бионанофармотехнологии в лечении злокачественных опухолей, инфекционных заболеваний).

### *1.2.3. Биотехнология: сфера «зеленой» защиты окружающей среды*

В этом аспекте биотехнология (рис. 1.8) влияет на медицину (здравоохранение), экологию (защита окружающей среды) и космос (создание замкнутых систем жизнеобеспечения в космосе).

Как видно из рис. 1.8, биотехнология осуществляет «зеленую» защиту живой и неживой среды от антропогенных факторов воздействия [21, 83, 125].

*Биотехнология защиты живых организмов и человека* развивается по трем основным направлениям:

– первое из которых направлено на получение фармацевтических препаратов;

– второе – на терапевтические услуги (молекулярная диа-

гностика генетических дефектов и инфекционных заболеваний, клеточная терапия, генная терапия);

– третье – связано с диетологией (продукты диетического питания).

*Биотехнология в экологии* означает, прежде всего, защиту окружающей среды и уменьшение её загрязнения. Данные биотехнологические мероприятия осуществляются путем:

– очистки атмосферного воздуха (биотехнология очистки воздушного бассейна);

– очистки природных и сточных вод (биотехнология очистки воды);

– очистки и восстановление почвы (биотехнология очистки и восстановления почв);

– переработки отходов производства и потребления (биотехнология переработки отходов производства и потребления);

– производства соединений, поддающихся расщеплению микроорганизмами (биодеградация трудно разлагаемых и токсических веществ);

– создания замкнутых технологических циклов (безотходная технология).

*Биотехнология в космосе.* Условия космической станции для живых организмов – это новая среда обитания, где постоянными и основными факторами воздействия являются невесомость, ионизирующие и электромагнитные излучения, а также отсутствие привычной биологической ритмики.

На сегодняшний день в области космической биотехнологии ставятся задачи, связанные с долгосрочным пребыванием человека в космосе и планированием им полетов на другие планеты и поэтому направленные на:

1) выявление и изучение возможного повреждающего действия факторов микрогравитации на структурные элементы генома и продуктов его экспрессии;

2) изучение адаптивных реакций живых организмов и разработка на их основе биотехнологических средств и способов защиты;

3) создание новых технологий и биоматериалов в условиях космоса.

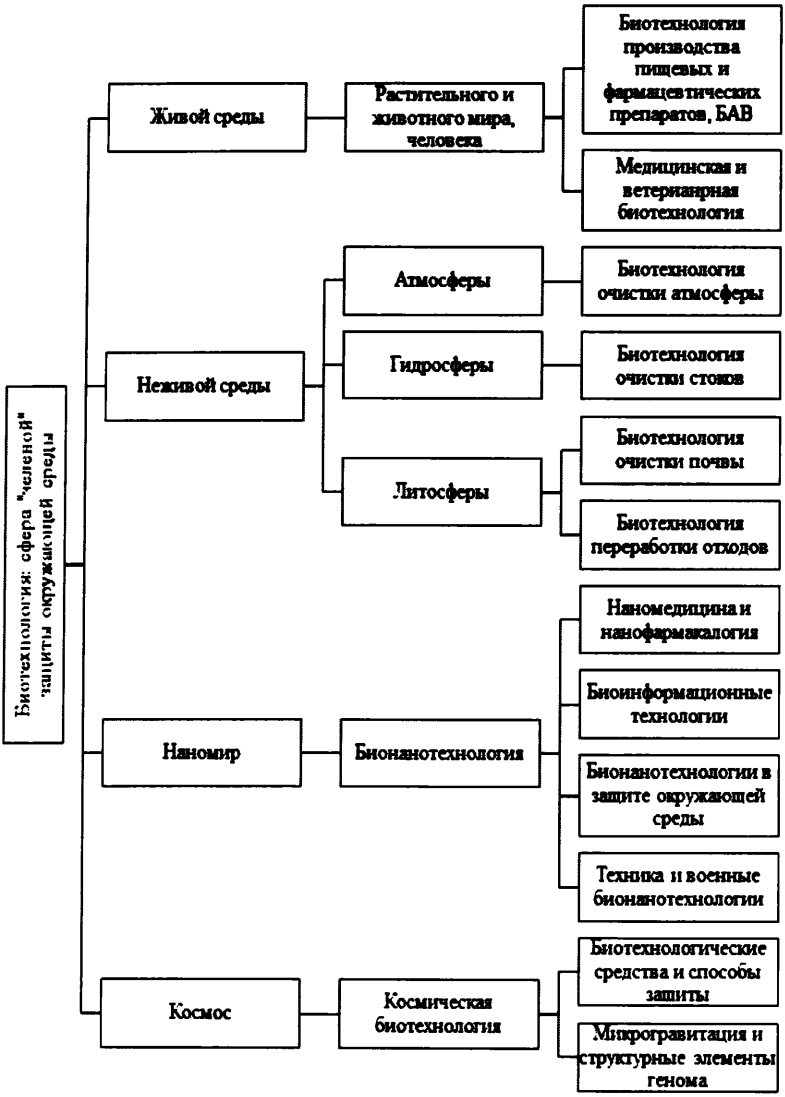



Рис. 1.8. Биотехнология: сфера *«зеленой»* защиты окружающей среды

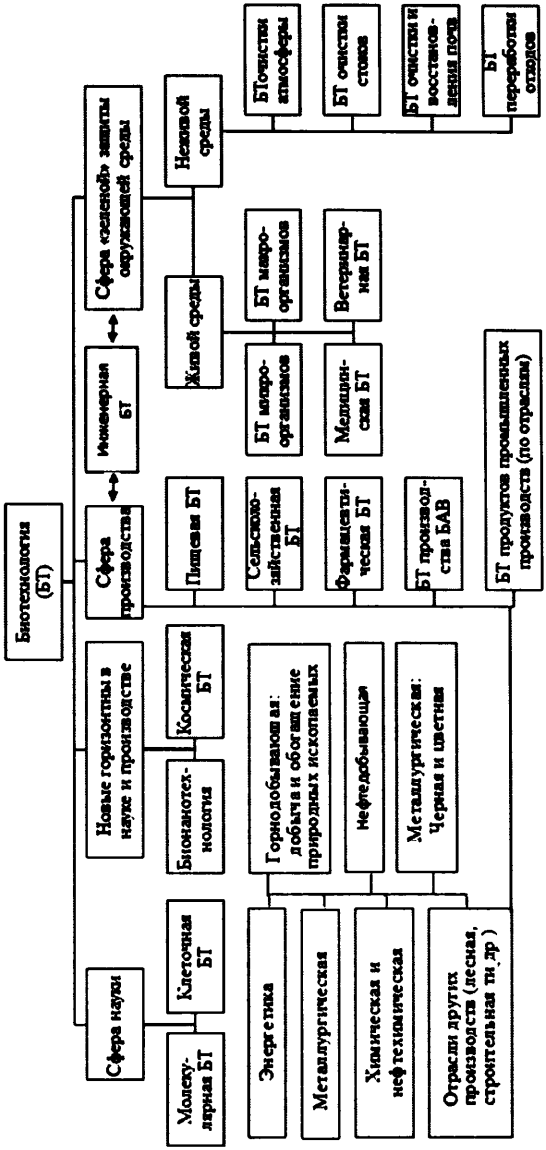



Рис. 1.9. Иерархия биотехнологических наук и производств (БТ – биотехнология)

Совершенно новые горизонты открываются перед биотехнологией при использовании последних достижений генной, клеточной и метаболической инженерии (биоинженерии).

В результате биотехнология, делая огромный шаг в науке, выходит на более *«тонкий и хрупкий»* рубеж – бионанотехнологию, представляющую собой совокупность методов и приемов, обеспечивающих конструирование полноценно функционирующих биообъектов с размерами 1 – 100 нм.

Резюмируя вышеизложенные сведения по биотехнологии, можно представить иерархию биотехнологических наук и производств в виде схемы, представленной на рис. 1.9.

Как видно из рис. 1.9, на сегодня в развитии биотехнологии наблюдаются тенденции, направленные с одной стороны на углубление (бионанотехнология) и расширение (космическая биотехнология) познавательных пространств, с другой – на полноценное обеспечение природными (биотехнология микроорганизмов, сельскохозяйственная биотехнология, пищевая биотехнология) и техногенными (биотехнология промышленных производств) продуктами, с третьей – на внедрение *«зеленых»* технологий в защите окружающей среды (экобиотехнологии, медицинская и ветеринарная биотехнология, фармацевтическая биотехнология, биотехнология производства БАВ) и, в четвертых – на улучшение инженерных условий биопроизводств (инженерная биотехнология).

### 1.3. Биотехнология и её связь с другими науками

Биотехнология – это не простое суммирование существующих наук, но и не сверхъестественная возможность. Использование научных достижений и практические успехи биотехнологии тесно связаны с фундаментальными исследованиями и имеют практическую реализацию на самом высоком уровне современной науки. В этом плане для биотехнологии нельзя не отметить её удивительную научную многоликость и производственную многофункциональность.

Биотехнология, как мультидисциплинарная наука, сложилась в результате *«научного симбиоза»* биологических (молекулярная и клеточная биология, биохимия, биофизика, физиология

и генетика, микро- и макробиология), технических (биологическая, медицинская и космическая техника; биоэлектроника; биоэнергетика) и экономических (экономика; промышленность) дисциплин.

Интегрированное использование фундаментальных и прикладных наук в технологических процессах с использованием живых молекул, культур клеток и организмов в оптимальных для них условиях обеспечивает воспроизводимое получение биотехнологической продукции на макроуровне.

### 1.4. История развития биотехнологии

Термин *«биотехнология»* впервые применен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки (K.Ereky). По словам К.Эреки, биотехнология – это *«все линии работ, которые производят продукты при помощи живых существ»* [28].

Но официальным научным признанием для биотехнологии стал 1961 г., когда шведский микробиолог К.Г.Хэден (C.G.Heden) рекомендовал переименовать научный журнал «Микробиология, биохимическая инженерия и технология» на «Биотехнология и биоинженерия». С этого времени биотехнология неотъемлемо связана с *«промышленным производством товаров и обслуживанием процессов путем использования биологических организмов, систем и процессов»* (Bernard R.Glick, 1998) [28].

Основными историческими событиями, которые стали опорными точками в развитии науки, являются работы [19, 20, 28, 70, 97, 124, 162, 163, 192]:

– В. Хип, трансплантировавшего эмбрион кролика (1890);

– Эвери, доказавшего, что ДНК – это генетический материал (1944);

– Дж. Уотсона и Ф. Крика, открывших двойную спираль ДНК (1953);

– Мезельсона и Сталя, раскрывших полуконсервативную модель репликации ДНК (1958);

– Барски, Сорьель и Корнефор, получивших соматический гибрид (1960);

– Джакобо и Моно, открывших модель оперона (1961);

– В. Арбер, Х. Смит и Д. Натанс, открывших (1962) и М. Мезельсон и Р. Юань (1968), выделивших ферменты рестрикции;

– Н. Бауэр и С.Кохан, создавших технологию рекомбинантного ДНК (1972);

– К. Гордон, клонировавшего ядро позвоночных животных (1975);

– Кери Миллиса, создавшего полимеразную цепную реакцию (1987);

– Крейг Вентер, синтезировавшего хромосому бактерии *Mycoplasma mycoides* (2010).

### 1.5. Коммерческие аспекты биотехнологии

Биотехнологическая программа, направленная на получение коммерческой продукции, осуществима на базе созданной самой природой минилаборатории, именуемой клеткой. Методами биотехнологии получены генно-модифицированные генотипы, т.е. организмы (ГМО), которые способны синтезировать заказные биологически активные полипептиды различного назначения. Рассмотрим это на примере производства инсулина и соматотропина, которые являются на сегодняшний день классическими примерами развития биотехнологической индустрии. Инсулин секретируется поджелудочной железой, а соматотропин, обладающий строгой видоспецифичностью – передней долей гипофиза. Диабетик, нуждающийся в лечении инсулином, должен получать примерно 40 единиц гормона в сутки. Недостаток соматотропина приводит к гипофизарной карликовости, частота встречаемости которой составляет 1 на 5 000 человек. Для лечения гормон инъецируется в дозах 10 мг на 1 кг массы три раза в неделю от возраста 4–5 лет до полового созревания. Благодаря технологии рекомбинантного ДНК в настоящее время производят около 100 000 молекул полипептида на бактериальную клетку: из 1 л бактериальной культуры можно получить 200 мг инсулина или 360 мг соматотропина. В первом случае это эквивалентно количеству, получаемого примерно из 800 г тканей поджелудочной железы, а во втором – из 35 г тканей передней доли гипофиза [100].

Коммерциализация биотехнологической продукции означа-

ет реализацию сконструированного в условиях лаборатории генетического детерминанта в масштабах производства. Коммерческая биотехнология имеет своей целью создание и практическое внедрение:

– безотходных и малоотходных технологий при производстве многопрофильных биотехнологических продуктов;

– новых биологически активных веществ, биодобавок и лекарственных препаратов, используемых в диетологии и медицине;

– биологических средств защиты сельскохозяйственной продукции, биоудобрений и регуляторов роста растений и животных;

– новых резистентноустойчивых и высокопродуктивных штаммов микроорганизмов, сортов растений и пород животных;

– новых биоинженерных методов для получения высокоэффективных препаратов различного назначения, используемых в индустрии;

– новых технологий создания и получения хозяйственно ценных продуктов для пищевой, химической и энергетической промышленности;

– эффективных технологий переработки отходов производства и потребления для получения продукции, используемых в различных отраслях хозяйственной деятельности человека.

В заключении следует отметить, что развитие биотехнологии в разных частях света заметно различается из-за политических, религиозных и экономических факторов, характерных для Запада и Востока, Севера и Юга, стран, имеющих высокий, средний и низкий экономический потенциал. Достижение превосходства в биотехнологии является одной их центральных задач в экономической политике развитых стран.

Контрольные вопросы

1. Что означает термин *«биотехнология»* и что она, как наука, изучает?

2. Что подразумевают под понятиями *«биотехнология – мультидисциплинарная наука»*, *«биотехнология - сфера науки»*, *«биотехнология - сфера производства»*, *«биотехнология – сфера «зеленой» защиты»*?

3. Перечислите и охарактеризуйте факторы, влияющие на развитие науки.

4. Какая дисциплина, на ваш взгляд, оказывает доминирующее влияние на развитие науки?

5. Какие принципы лежат в основе разделения биотехнологии на фундаментальную и прикладную, молекулярную и клеточную; микроорганизмов и макроорганизмов; промышленную и экологическую; промышленную и инженерную?

## 2. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Успехи молекулярной биологии послужили основой для создания технологии, направленной на выделение, конструирование, амплификацию, трансформацию и экспрессию отдельного гена.

На языке биотехнологии чужеродный ген, вводимый в новый геном, называют *трансгеном* (TG), а сам процесс переноса сконструированной генетической конструкции с одной биологической системы в другую – *трансгенозом* [28, 70, 97, 124].

Генотип, в котором осуществляется экспрессия чужеродного гена, называется *трансгенным* (генно-модифицированный организм – ГМО) [28].

На рис. 2.1 представлена блок-схема технологии конструирования генетической и биологической программы развития.

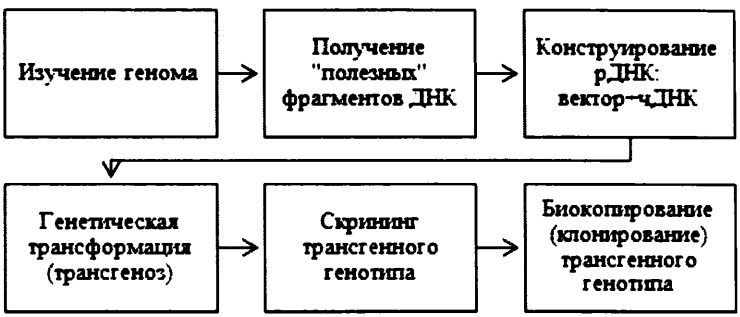



Рис. 2.1. Блок-схема технологии конструирования генетической и биологической программы развития

Как видно из рис. 2.1, при конструировании генетической программы развития предполагают создание искусственной молекулы ДНК, названной рекомбинантной (рДНК). При трансгенозе рДНК в *«геном-мишень»* образуется новая генетическая программа. При успешной интеграции рДНК в геном, выполняется следующая задача – конструирование биологической программы развития, направленная на биокопирование ценного генотипа методом клонирования (размножение сконструированного генотипа).

## 2.1. Ферменты рекомбинантного ДНК

Ферменты рДНК – это выделенные чаще из бактерий, реже из вирусов и некоторых эукариот высокоспецифичные биокатализаторы, предназначенные для воздействия на ДНК в условиях *in vitro*. Применение ферментов ДНК для конструирования рекомбинантного ДНК зависит от их доступности, стабильности и отсутствия в них примесей [217].

При конструировании генов *in vitro* ферментативное воздействие на ДНК осуществляется по всем биологическим предписаниям и руководствам, действуемых *in vivo* (от лат. *«в живом»*).

Ферменты рекомбинантного ДНК в зависимости от воздействия на молекулу ДНК классифицируют на три класса: рестриктазы, полимеразы и лигазы (табл. 2.1) [8, 40, 112, 131, 165, 166].

Таблица 2.1

Ферменты рекомбинантного ДНК [8, 40, 112, 131, 165, 166]

| № п/п | Класс | Определение | Особенность |
|---|---|---|---|
| 1 | Гидролазы (рестриктазы) | расщепляют молекулу ДНК в строго специфичных сайтах рестрикции | Субстратная специфичность определяется тремя узловыми характеристиками: сайтом рестрикции, сайтом расщепления и зависимостью действия рестриктаз от характера метилирования оснований в пределах сайта рестрикции. Участок на молекуле ДНК, распознающийся рестриктом называют *сайтом рестрикции* |
| 2 | Синтетазы (полимеразы) | матрица зависимые, катализируют полуконсервативный синтез новых цепей ДНК | Для инициирования синтеза новой полимерной цепи требуется присутствие праймера (затравки) со свободной концевой 3'-ОН. *Праймер* – короткий фрагмент РНК, необходимый для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи |

продолжение табл. 2.1

| № п/п | Класс | Определение | Особенность |
|---|---|---|---|
| 3 | Лигазы | способны в местах разрывов ДНК образовывать фосфодиэфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксинуклеотидов | Основным условием для успешного лигирования является отжиг комплементарных (*«липких»* или *«тупых»*) концов. *Отжиг* – связь праймера с одноцепочечной матрицей |

Из табл. 2.1 следует, что с помощью ферментов первого класса осуществляют фрагментацию ДНК, модификацию концевых групп, второго – синтез комплементарной цепи и третьего – лигирование ДНК.

**Рестриктазы.** На сегодня описано более 3500 рестрикционных эндонуклеаз прокариотической природы и более 200 разных сайтов рестрикции. При конструировании чужеродного гена и вектора широко применяются рестрицирующие эндонуклеазы класса II, которые узнают специфический палиндромный участок в молекуле ДНК [98, 167, 183].

Длина сайтов для различных эндонуклеаз варьирует от 4 до 50 пар нуклеотидов. Каждая рестриктаза оказывает воздействие только на «свой» сайт рестрикции, разрезая ДНК на одинаковый набор фрагментов.

Рестрицирующие эндонуклеазы типа II применяются для молекулярного клонирования и картирования сегментов ДНК. В первом случае получают рекомбинантную ДНК, во втором – физическую (рестрикционную) карту ДНК. Оптимальные условия рестрикции для каждой рестриктазы индивидуальны и зависят от pH, температуры проведения реакции, ионной силы и присутствия определенных ионов.

Название каждого фермента складывается из трех основных положений: первая прописная буква свидетельствует о названии рода, вторая и третья строчные буквы – о названии вида, прописные буквы R (рестрикт) или M (метилаза) в ком-

плексе с римскими цифрами указывают на систему, например, EcoRI – *Escherichia coli* RI.

Рестриктазы классифицируют по категориям в зависимости от:

– воздействия на нуклеиновые кислоты и области ДНК;

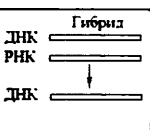
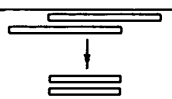
– сайта рестрикции, размера сайтов рестрикции и длины получаемых фрагментов, преобразования сайтов рестрикции;

– стороны гидролиза и характера образуемых концов.

В табл. 2.2 дана краткая характеристика часто используемых рестриктаз по воздействию на определенные типы нуклеиновых кислот (на примере EcoRI, РНКазаН, Нуклеаза SI).

Таблица 2.2

Краткая характеристика рестриктаз по воздействию на определенные типы нуклеиновых кислот

| Показатель | Рестриктазы | | |
|---|---|---|---|
| | EcoRI | РНКазаН | Нуклеаза SI |
| Источник | Кишечная палочка с клонированным геном *E.coli* RY 13 | *Escherichia coli* | Плесневый гриб *Aspergillus oryzae* |
| Краткая характеристика | Разрезает ДНК на характерный набор фрагментов, названных *фингерприт («отпечатки пальцев»)* | Катализирует деградацию РНК | Гидролизует как ДНК, так и РНК |
| Схема действия | Гидролизует в палиидроме фосфодиэфирные связи между G и A с образованием «липких» концов | Расщепляет цепь РНК в гибридном дуплексе РНК-ДНК | Образует 5'-монофосфатные и 3'-гидроксильные концы |
| |   |   |  |
| Применение | Для определения первичной структуры ДНК | Используют в качестве реактива | Для удаления однонитевых концов |

Как видно из табл. 2.2, по воздействию на определенные типы нуклеиновых кислот различают рестриктазы, действующие на молекулу ДНК (например, EcoRI), на молекулу РНК (например, РНКазаН) или как на молекулу ДНК, так и на молекулу РНК (например, Нуклеаза SI) [28].

По типу сайтов узнавания и разрезания различают рестриктазы, действующие на палиндромные сайты рестрикции (например, EcoRI) или на непалиндромные сайты узнавания с разрезанием на некотором расстоянии от них (например, MboII, HphI; рис. 2.2).

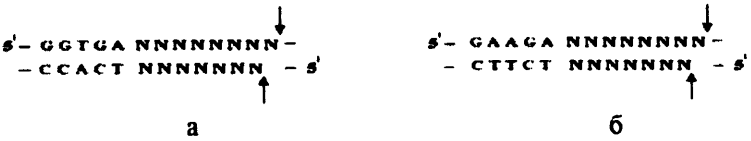



Рис. 2.2 Группа рестриктирующих эндонуклеаз типа II (а – Hph I, б – Mbo II),разрезающие цепи ДНК на определенном расстоянии от сайта узнавания

По характеру образуемых концов различают рестриктазы, образующие на фрагментах ДНК «липкие» одноцепочечные концы (например, EcoRI) или «тупые» двухцепочечные концы (например, Sma I; рис. 2.3).




Рис. 2.3. Расщепление фрагмента ДНК рестрицирующей эндонуклеазой типа II SmaI с образованием «тупых» концов

По качественному преобразованию сайтов рестрикции различают[28, 61]:

*изошизомеры*, имеющие одинаковые сайты рестрикции, например, SphI и BbuI (CGTAC*G);

– *полиизомеры*, обладающие разными сайтами рестрикции (например, EcoRI).

Также различают:

– *гетероизомеры*, имеющие одинаковые сайты рестрикции, но разрезающие его по-разному, например, SmaI (GGG*CCC) и XmaI (G*GGCCC);

– *изокаудомеры*, распознающие разные сайты рестрикции, но образующие одинаковые концы [58, 103].

Таким образом, огромный диапазон специфичности позволяет рестриктазам разрезать практически любую молекулу ДНК на дискретные фрагменты самыми разными способами. Полученные таким образом фрагменты можно разделить по размерам с помощью гель-электрофареза.

**Полимеразы.** Полимеразы *in vitro* способны:

– синтезировать ДНК на РНК-матрице (ревертаза);

– производить полимеризацию без матрицы и синтезировать *«липкие»* концы (терминальная трансфераза);

– присоединять нуклеотидные остатки к 3'-цепи без участия матрицы (поли-А-полимераза).

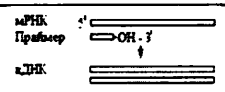
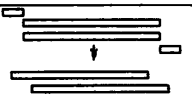
В первом случае конечным продуктом является комплементарная ДНК (кДНК), во втором – одноцепочечные полимеры или *«липкие»* концы, в третьем – поли-А-концы на РНК (табл.2.3) [157, 160, 169, 175, 201].

Таблица 2.3

Биотехнологическая сущность полимераз

| Название | Ревертаза | Терминальная трансфераза | Поли-А-полимераза |
|---|---|---|---|
| Источник | Ретровирус | Тимус теленка | *Escherichia coli* |
| Краткая характеристика | обладает тремя свойствами: полимеразной, гидролизующей, эндонуклеазной | не нуждается в матрице и не способна что-либо копировать вообще | присоединяет нуклеотидные остатки к 3'-концу цепи без участия матрицы |

продолжение табл. 2.3

| Название | Ревертаза | Терминальная трансфераза | Поли-А-полимераза |
|---|---|---|---|
| Применение | для синтеза кДНК с РНК, для гидролиза РНК в дуплексе РНК-ДНК, для введения радиоактивной метки в ДНК-зоиды | к «тупым» концам ДНК присоединяет «липкие» концы | использует для присоединения poly(A)-концов к молекулам РНК при синтезе кДНК |
| Схема действия | Синтез начинается с праймера: полидезоксириботимидиловой кислоты - poli(dT) | Образует одинаковые 3'-хвосты; предпочитает одноцепочечные праймеры | на 3'-OH-конце РНК образует полиадениловые цепочки длиной до несколько тысяч звеньев |
| |   |  | 5'-NN-3'-OH + nATP → 5'-NN($A_n$)- 3'-OH + nPPi |

В дополнение к табл. 2.3 следует отметить, что с помощью *полимераз*:

– заполняются бреши в цепи ДНК;

– включают в растущую цепь модифицированные основания (например, дидезокси-нуклеотидтрифосфаты – ddNTP);

– выполняются *«редактирующие»* функции путем удаления присоединенных нуклеотидов;

– вводятся радиоактивные метки во фрагмент ДНК;

– проводится амплификация любого фрагмента ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

При оптимальных условиях *in vitro* скорость работы фермента составляет около 10–50 (ДНК-полимераза *E.coli*) – 320 (ДНК-полимераза фага Т7) нуклеотидов в секунду.

ДНК-полимеразы реализуют свою активность при температуре 42 °С – 72–95 °С (Tag-полимераза) [28]:

1. ДНК-полимераза I *E.coli* катализирует и некоторые другие важные реакции:две из них имеют особое значение для экспериментов с рекомбинантной ДНК – это 3' → 5'- и 5' → 3'-экзонуклеазные реакции:

– первая обеспечивает точность полимерезации, направляемой матрицей,

– вторая – деградацию одной из двух цепей ДНК, начиная со свободного 5'-конца (способна катализировать одновременно как полимеризацию, так и 5'→3'-экзонуклеазное расщепление).

2. ДНК-полимераза фага Т7 (секвеназа) – генетически модифицированная Т7 ДНК-полимераза используется для секвенирования ДНК с помощью ddNTP;

3. Taq ДНК-полимераза, выделенная из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, имеет температурный оптимум ферментативного действия 72-95°С (используют для секвенирования ДНК (60 нуклеотидов в секунду), особенно ДНК с высоким содержанием GC-пар и сильной вторичной структурой).

Кеназы катализируют фосфорилирование многих биохимических соединений, фосфатазы – отщепляют концевые фосфомоноэфирные группы.

Первые выделены и очищены из клеток *E.coli*, инфицированных бактериофагом Т4 и широко используются в качестве реактивов в экспериментах с ДНК, мечения 5'-конца полинуклеотидной цепи с помощью радиоактивного $^{32}P$, вторые – выделены из клеток *E.coli* и кишечника теленка и используются при анализе структуры ДНК [3].

**Лигазы**

Различают две группы лигаз:

– первые (ДНК-лигаза *E. coli*) осуществляют лигирование только *«липких»* концов ДНК,

– вторые (ДНК-лигаза фага Т4) – только *«тупых»* концов ДНК.

ДНК-лигаза фага Т4, соединяя *«тупые»* концы, катализирует образование фосфодиэфирных связей в обеих цепях. Лигирование рестриктов осуществляют при пониженных температурах (4–12°С).

## 2.2. Основные этапы работ с ДНК

### *2.2.1. Получение ДНК*

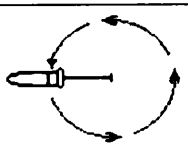
ДНК получают из всех живых организмов. Для получения ДНК достаточно несколько капель клеточной культуры. Чтобы извлечь ДНК, следует разрушить клетку (табл. 2.4).

Как видно из табл. 2.4, технология получения ДНК складывается из трех этапов – получения нуклеиновых кислот, очистки от белков и удаления РНК.

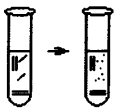
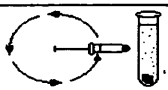
После получения ДНК ее разрезают с помощью рестриктаз на фрагменты нужной длины, затем изучают ее молекулярную структуру.

Таблица 2.4

Технология получения ДНК (на примере ДНК бактерий) [103]

<table>
<tr><td>№ п/п</td><td>Наименование</td><td colspan="2">Схематическое изображение процесса с кратким описанием</td></tr>
<tr><td rowspan="2">1</td><td rowspan="2">Получение ДНК</td><td colspan="2">Ферментативное воздействие на клетку:</td></tr>
<tr><td>1.1) лизоцимом – приводит к разрушению клеточной стенки</td><td>1.2) дегергентом – разрушает жировые компоненты клеточной мембраны</td></tr>
<tr><td rowspan="4">2</td><td rowspan="4">Очистка ДНК</td><td>2.1) Центрифугирование</td><td>2.2) Химическая экстракция фенолом</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">Получаемый результат</td></tr>
<tr><td>осаждение крупных и тяжелых молекул (нуклеиновая кислота, белок)</td><td>белки растворяются в феноле, а ДНК и РНК остаются в воде</td></tr>
</table>

продолжение табл. 2.4

| № п/п | Наименование | Схематическое изображение процесса с кратким описанием | | |
|---|---|---|---|---|
| 3 | Удаление РНК | 3.1) ферментативное воздействие на РНКрибонуклеазой | 3.2) добавление спирта | 3.3) центрифугирование |
| | |  |  |  |
| | | Получаемый результат | | |
| | | РНК разрушается на отдельные фрагменты, ДНК остается неизменной | Равное соотношение спирта с раствором | ДНК извлекают из раствора из дна пробирки |

### *2.2.2. Построение рестрикционной карты*

При воздействии на ДНК нужной рестриктазой получают набор фрагментов. А при использовании набора целевых ферментов рестрикции вначале по отдельности, а затем – комбинируя их можно установить порядок следования сайтов рестрикции вдоль молекулы ДНК [139, 226].

*Рестрикционная карта* – диаграмма местоположения на нуклеотидной последовательности ДНК сайтов, узнаваемых различными рестриктазами [28].

Построение рестрикционной карты предполагает поэтапное выполнение процедур, расписанных в табл. 2.5.

Как видно из табл. 2.5, для построения рестрикционной карты вначале следует на ДНК воздействовать ферментационно (рестриктазами вначале раздельно, затем – смесью), далее – после электрофореза осуществляют картирование сайтов рестрикции.

Полученная рестрикционная карта ДНК указывает на порядок следования сайтов рестрикции и расположение каждого сегмента в исходной молекуле.

Таблица 2.5

Технология изучения макроструктурной организации ДНК [103, 214]

<table>
<tr><th>№ п/п</th><th>Этап работы</th><th colspan="3">Схематическое изображение процесса с кратким описанием</th></tr>
<tr><td>1</td><td rowspan="2">Ферментативное воздействие на ДНК рестриктазами (вначале воздействуют раздельно, затем – смесью)</td><td colspan="3">результаты гель-электрофареза фрагментов ДНК при воздействии ферментов рестрикции:</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Гель-электрофорез</td><td>E.coliRI</td><td>BamHI</td><td>E.coliRI + BamHI</td></tr>
<tr><td>3</td><td>Картирование сайтов рестрикции (радиоавтограф считывает снизу)</td><td colspan="3">по электрофоретическим данным строят рестрикционную карту</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td colspan="3">Рестрикционная карта ДНК указывает на порядок следования сайтов рестрикции и расположение каждого сегмента в исходной молекуле</td></tr>
</table>

### *2.2.3. Определение молекулярной структуры ДНК*

Технология определения молекулярной структуры ДНК складывается из следующих этапов работ [59, 123, 130, 148, 203–207,218, 220, 225]:
секвенирование → гель–электрофорез → радиоавтография → чтение нуклеотидной последовательности ДНК → анализ и создание базы данных (табл. 2.6).

Интерпретируя содержание табл. 2.6, следует отметить, что для раскрытия структуры генома его сначала расщепляют на фрагменты, далее путем секвенирования определяют нуклеотидную последовательность этих фрагментов, после чего с по-

мощью специально созданных компьютерных программ создают карту генома [172, 173, 180, 181].

На рис.2.4 представлена блок-схема технологии картирования генома.

Как видно из рис. 2.4, в процессе проведенных технологий можно раскрыть полную последовательность молекулы ДНК.

Таблица 2.6

Технология определения молекулярной структуры ДНК [137, 138, 139, 140, 227–230]

| № п/п | Этапы работ | Определение | Принцип | Особенность |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Секвенирование | Метод определения первичной структуры ДНК | Химическая деградация (А. Максам, В. Гилберт) или ферментативный синтез (Ф. Сэнгер) | Осуществляют химическим и ферментативным способами |
| 2 | Гель-электрофорез | Метод разделения фрагментов ДНК по размеру и форме | Два электрода (+и–) регулируют движение молекул, а пористая структура геля – разделяет молекулы по размеру | В 1,0 %-м агарозном геле разделяют крупные молекулы ДНК; в 20 %-м полиакриламидном геле – более мелкие |
| 3 | Авторадиография | Метод изучения распределения радиоактивных изотопов в биообъекте | Маркирование изучаемых молекул изотопным индикатором обеспечивает фотографическое изображение | Используют прямую и непрямую радиоавтографию (фотографическое изображение возникает благодаря β-частицам, испускаемым радионуклидом) |

продолжение табл. 2.6

| № п/п | Этапы работ | Определение | Принцип | Особенность |
|---|---|---|---|---|
| 4 | Чтение ДНК | Метод считывания последовательности нуклеотидов (способы: ручной, полуавтоматический, автоматический) | Чтение нуклеотидной последовательности (видимых «лестничных полос») осуществляют с радиоавтографа геля | Начинается всегда с фрагментов ДНК меньшего размера (чтение «снизу → вверх») по направлению 5'→3' (по Сэнгеру) или зависит от меченого первого нуклеотида – 5'→3' или 3'→5' (по Максаму-Гилберту) |
| 5 | База данных ДНК-GenBank | Компьютерная база данных последовательностей ДНК | Присваивают идентификационный (Banklt ID), затем - регистрационный (Accession number) номер | Нуклеотидную последовательность расшифровывают с помощью высокоэффективных компьютерных программ |

Ниже вкратце приводится характеристика методов, перечисленных в табл. 2.6 и показанных на рис. 2.4.

**Гель-электрофорез.** Пропуская заряженные молекулы через сетчатую структуру геля, происходит деление фрагментов по размерам. Принцип метода заключается в том, что положительно заряженные молекулы движутся в сторону отрицательного электрода, а отрицательные – к положительному [161, 171] (рис. 2.5; табл. 2.7).

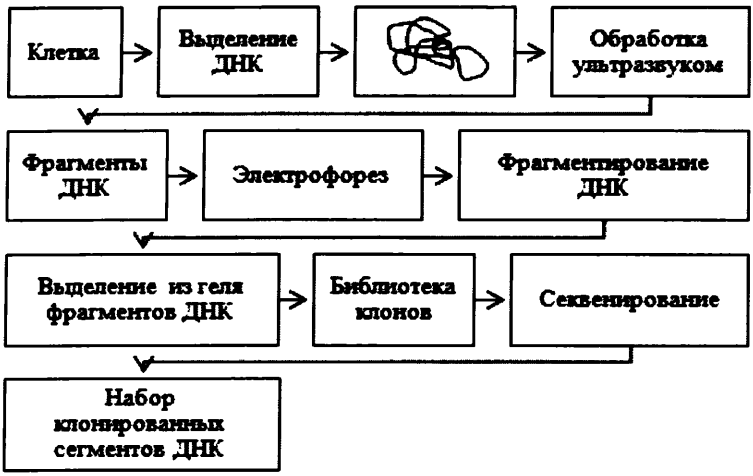



Рис. 2.4. Блок-схема технологии картирования генома

Таблица 2.7

Гель-электрофорез: этапы работ [28, 103]

| № п/п | Последовательность процедур | Получаемый результат |
|---|---|---|
| 1 | Макромолекулу помещают в лунку, расположенную у края геля (полужидкая среда с сетчатой пространственной структурой) | Фрагменты макромолекул перемещаются в электрическом поле: отрицательно заряженная ДНК направляется от катода к аноду; большие по размеру ДНК движутся медленнее по сравнению с ДНК меньшего размера |
| 2 | Воздействие на бесцветную ДНК красителем этидиум-бромид | ДНК окрашивается в оранжевый цвет (визуально прослеживается под ультрафиолетовым освещением) |
| 3 | Из агарозной пластины вырезаются места, окрашенные оранжевым | ДНК экстрагируют для получения чистых фрагментов |




Рис.2.5. Гель-электрофорез

Требование, предъявляемое методу электрофоретического разделения молекул ДНК – его разрешающая способность, благодаря которому разделяются одноцепочечные фрагменты ДНК, отличающиеся друг от друга на один нуклеотид [150, 153, 209–213].

Для фиксации и последующего высушивания геля применяются в основном специальные Gel-Fix пленки. Фрагменты ДНК выходя из геля сорбируются на пленке в зависимости от размера в определенном месте [103].

**Секвенирование ДНК.**Сущность метода, вне зависимости от подхода – химического или ферментативного, направлена на секвенирование фрагментов ДНК, размером 600 нуклеотидов [71, 119, 138, 149, 151, 158].

В табл. 2.8 рассмотренные методы секвенирования даны в сравнительном аспекте.

Таблица 2.8

Отличия метода секвенирования ДНК по Максаму-Гилберту от метода Сэнгера [132, 144–146]

| Показатель | Секвенирование | |
|---|---|---|
| | химическое | ферментативное |
| Последовательность фрагмента ДНК определяется | в каком-либо подходящем векторе (т.е. реплицировавшего *in vivo*) | с ddNTP – новосинтезированная *in vitro* копия |
| Секвенирование может начаться | практически с любого сайта узнавания | только после подготовки молекул ДНК |

продолжение табл. 2.8

| Показатель | Секвенирование | |
|---|---|---|
| | химическое | ферментативное |
| Основа метода | необходимо наличие одно- или двухцепочечного фрагмента, несущего на одном из своих концов единственную метку | необходимо наличие немеченой матрицы ДНК и при этом желательно одноцепочечное |

На сегодня секвенирование ДНК полностью автоматизировано и проходит в ДНК-секвенаторах: для секвенирования генов используют принцип Сэнгера, для секвенирования целых геномов – технологию Next-generation sequencing. Новые разработанные методы (SOLiD, IonTorrent, Helicos и др.) базируются на секвенировании ДНК-чипов с использованием циклических ферментативных реакций с последующим сбором полученной информации в виде иллюстраций [25, 69, 103, 168, 177, 182, 233, 234].

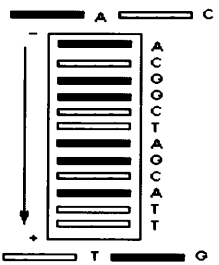



Рис. 2.6. Автоматическое флуоресцентное секвенирование

Все процедуры в таких аппаратах проходят по общепринятой методике, с той лишь разницей, что перед проведением реакции синтеза цепей праймеры метятся флуоресцентными красителями (для каждой из четырех реакций используется один и тот же праймер, но помеченный разными красителями). Единую смесь помещают на гель и разделяют по одной дорожке, как это показано на рис. 2.6. В итоге, получаются полосы четырех цветов соответственно типам нуклеотидов основания [95, 135, 215].

Производительность секвенаторов нового поколения измеряется уже сотнями миллиардов пар оснований, что позволяет сканировать индивидуальный геном за несколько часов [103, 164, 184, 185, 191, 197–200].

***Полимеразная цепная реакция (ПЦР).*** Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – *in vitro* амплификация определенных фрагментов ДНК с помощью специфических праймеров, приводящая за короткий промежуток времени к наработке значительных количеств нужных участков ДНК (табл. 2.9).

Цепной данная реакция названа потому, что продукты, наработанные ДНК-полимеразой в ходе предыдущих циклов, используются в последующих циклах [188].

Статистически выявлено, что и замена нуклеотидов, и сдвиг рамки считывания в ходе ПЦР происходят реже, чем 1 событие на 100 000 нуклеотидов. Таким образом, каждый цикл (за исключением первых двух) позволяет удвоить количество ДНК.

Таблица 2.9

Полимеразная цепная реакция [28, 136]

| № п/п | Показатель | Краткое разъяснение |
|---|---|---|
| 1 | Разработчик | Кэрри Муллис, 1987 |
| 2 | Применение | Молекулярное клонирование фрагментов ДНК, т.е. селективная амплификация нужного фрагмента ДНК |
| 3 | ПЦР–амплификация | Все реакции протекают в пробирках, погруженных в термостат |
| 4 | Технологический принцип | Три шага цикла: Шаг 1 – Денатурация (90–95 °С). Шаг 2 – Отжиг праймеров (50–60°С). Шаг 3 – Достраивание праймеров (72–75 °С). Каждый цикл в автоматическом режиме повторяется до 40 |
| 5 | Компоненты ПЦР | Матрица, заданная последовательность, праймеры (затравка), термостабильная ДНК-полимераза, «Строительный материал» в виде смеси dNTP |
| 6 | Молекулярная масса и количество продукта ПЦР | Определяют методом гель-электрофорез. За несколько часов количество исходной ДНК достигает до $2^{10}$ копий |

Метод ПЦР используется в клинической диагностике, генетическом анализе, генной инженерии, судебно-криминалистическом анализе [103].

***Радиоавтография, компьютерный анализ и база данных.*** Расшифровка ДНК осуществляется с помощью компьютерных программ, нуклеотидная последовательность выводится на дисплей.

Сведения о полных геномах собираются в базах данных, например, в таких как: GSDB (Genome Se-quence DataBase; http://www.ncgr.org), GenomeDatabase (GDB: http:gdb.oig), SWISS-PROT (http://www.expasy.ch) и др.

## 2.3. Основы конструирования рекомбинантной ДНК

Технология конструирования рДНК складывается из четырех этапов работ: конструирование чДНК, вектора и рДНК, перенос в клетку, скрининг и клонирование (рис. 2.7) [29, 30, 136].




Рис. 2.7. Блок-схема конструирования рДНК:
*рДНК – рекомбинантная ДНК, вДНК – векторная ДНК, чДНК чужеродная ДНК*

Как видно из рис. 2.7, сконструированная рДНК складывается из таких элементов, как вДНК и чДНК. При этом вектор конструируется на основе естественных репликонов – вирусной и плазмидной ДНК. Ниже раскрывается биотехнологическая сущность вектора и чДНК.

### *2.3.1. Векторная, чужеродная и рекомбинантная ДНК*

*Вектор* – сконструированная *in vitro* молекула ДНК, способная присоединять к себе (акцептировать) чДНК, трансфор-

мировать её в клетку и обеспечивать ей там репликацию и экспрессию.

Успех в конструировании векторных молекул обеспечивается при соблюдении следующих принципов:

1) роль вектора плазмидная и вирусная ДНК выполняют лишь после молекулярного конструирования *in vitro*;

2) вектор должен быть сравнительно маленькой и управляемой молекулой ДНК;

3) перемещение вектора из клетки в клетку, их клонирование должно быть простым.

В табл. 2.10 дана классификация векторных ДНК [28, 103, 105, 133, 134, 147, 152, 187, 237].

Таблица 2.10

Классификация векторного ДНК
[28, 103, 105, 133, 134, 147, 152, 187, 237]

| Категория | Классификация | Пример |
|---|---|---|
| Происхождение | плазмидные | pBR322 – существуют в клетке и вне ее в виде молекул ДНК |
| | фаговые | λ, M13 – существуют в виде молекул ДНК и вирионов |
| | гибридные | Фагмида, космида, хорамида, фазмида – сочетают отдельные свойства плазмид и фагов |
| По вмещаемой емкости встраиваемого фрагмента | микрофрагментные | вмещают в себя фрагмент чДНК длиной не более 10 kb *(«классические»* плазмидные векторы) |
| | медиумфрагментные | не более 20 kb (бактериофаги) |
| | макрофрагментные | более 40 kb (фагово-плазмидные) |
| | мегафрагментные | от 1 Mb и более (искусственные хромосомы) |

продолжение табл. 2.10

| Категория | Классификация | Пример |
|---|---|---|
| По системе хозяина (по числу репликаторов, имеющихся в векторном геноме) | монорепликонные | реплицируются в строго определенных клетках: векторы прокариот: грамположительных (pPL703) и грамотрицательных (pBR322) бактерий; векторы эукариот: низших (YRp) и высших эукариот (pTi; P-вектор; Zip-X) |
| | бирепликонные | реплицируются в клетках различных видов (векторы с широким кругом хозяев - челночные векторы) |
| По структуре | кольцевые | плазмидные векторы |
| | линейные | фаговые векторы и искусственные хромосомы |
| По профилю использования | клонирования | pBR322; λ |
| | секвенирования | M13 |
| | трансформации | ретровирусные векторы |
| | экспрессии | вирусы на основе бакуловирусов |
| По способу поддержания в клетке | автономные | реплицируются самостоятельно |
| | интегративные | реплицируются в составе клеточной хромосомы |
| | низкокопийные | pRK290 |
| | высококопийные | pPL703 |

Как видно из табл. 2.10, векторы классифицируют по происхождению (плазмидные, фаговые, гибридные), вмещаемой емкости встраиваемого фрагмента (микро-, медиум-, макро- и мегафрагментные), структуре (кольцевые, линейные), системе хозяина (моно- и биорепликативные), способу поддержания в клетке (автономные, интегративные), профилю использования (клонирования, секвенирования, трансформации и экспрессии) и копийности (низко- и высококопийные).

Биотехнологический аппарат состоит из двух взаимодополняющих компонентов – вектора и реципиентных клеток, а также из методов переноса первых во вторые. Плазмидные векторы вводят в реципиентные клетки трансформацией – кальциевым методом или электропорацией, а фаговые – инфицированием или трансфекцией.

Вне зависимости от природного происхождения и назначения векторная конструкция должна отвечать трем ключевым *требованиям*:

1) быть репликоном для стабильного существования в клетке;

2) иметь селективный маркер для отбора трансформированных вектором клеток;

3) иметь сайт рестрикции для интеграции чДНК в вектор.

Количество требований, предъявляемых вектору, могут возрастать в зависимости от цели и конкретных задач эксперимента.

*Челночные векторы* – это векторы с широким кругом хозяев, способные реплицироваться в клетках про- и эукариот. Большинство эукариотических векторов являются челночными.

*Фаговые векторы* конструируют на базе ДНК фагов с таким расчетом, чтобы в них сохранилась информация, обеспечивающая сборку (*in vivo*; *in vitro*) рДНК в фаговые головки [92, 174, 233].

Векторы на основе фаговых ДНК имеют следующие *свойства*:

1) многие упаковываются *in vitro* в капсиды;

2) позволяют клонировать гены, продукты которых токсичны для клетки;

3) относительно легко выделяются из клеток и отбираются.

Выбор типа вектора – плазмидного или фагового зависит от:

1) размера вводимого фрагмента;

2) относительного содержания нужного фрагмента;

3) цели эксперимента.

В классические плазмидные векторы могут встроиться чужеродные фрагменты емкостью от 10 до 15 kb. Плазмидные векторы наиболее универсальны. В мультикопийных плазмидах клонируют, как правило, фрагменты ДНК небольших размеров (до 10 kb), в малокопийных – средних (30–40 kb) и больших (50–100 kb) размеров [132].

Распространенными векторами для грамотрицательных бактерий (*E.coli*) являются λ и M13, грамположительных (*B. subtilis*) – φ105, для клеток дрожжей – YIp, клеток растений – CaMV, клеток животных – SV40, вектор ретровирусного и аденовирусного происхождения.

Одним из преимуществ, характерных для фаговых векторов по сравнению с плазмидными является то, что рекомбинантный фаговый вектор можно клонировать без предварительного отбора содержащих их клеток.

Фаговые рекомбинантные ДНК вводят в клетки в виде изолированной ДНК (трансфекция; эффективность $>10^4$ рекомбинантных клонов на 1 мкг донорной ДНК) или реконструированных вирусных частиц (инфекция; эффективность $>10^6$ рекомбинантных клонов на 1 мкг донорной ДНК). В любом случае в клетке, инфицированной одной молекулой рекомбинантного вирусного вектора, образуется вирусное потомство, которое будет инфицировать соседние клетки, лизировать их с образованием бляшек.

К фагово-плазмидным векторам относят космиды, фагмиды, хорамиды и фазмиды. Эти векторные ДНК могут существовать двояко: их плазмидная часть дает им возможность реплицироваться в бактериях и проводить отбор бактериальных клеток, а часть, принадлежащая геному фага, обеспечивает их упаковку в оболочку и трансдукцию в реципиент за счет инфекционных свойств этого фага.

*Векторы клонирования* – это молекулярные конструкции, предназначенные для амплификации чДНК посредством репликации. Такие векторы могут амплифицировать фрагменты чДНК только определенного размера.

*Векторы секвенирования* предназначены для определения нуклеотидной последовательности клонированных ДНК.

*Векторы трансформации* обеспечивают для рДНК интеграцию в клеточные геномы путем встраивания их в хромосомную ДНК.

Интеграция рДНК в хромосому осуществляется путем либо негомологичной рекомбинации в случайные участки генома (инсерционная трансформация у животных), либо – гомологичной рекомбинации между донорной ДНК и сайтом-мишенью

генома (стабильная трансформация у дрожжей). Интеграция рДНК в хромосому имеет следующие преимущества (с точки зрения биотехнологии):

1) организм приобретает новый *«заказной»* признак, следовательно, и генотип;

2) приобретенный «заказной» признак должен быть, во-первых, стабильным и, во-вторых, не зависеть от давления отбора или сохранения рДНК в будущих поколениях;

3) интегрированная рДНК реплицируется вместе с клеточным геномом.

Кроме того, векторы трансформации могут обеспечить для рДНК стабильное присутствие в виде внехромосомного ДНК (векторы, полученные на основе папилломы крупного рогатого скота). Для трансформации рДНК и изучения экспрессии чДНК используют культуру клеток животных. В питательных средах клетки животных растут и делятся по-разному: одни типы клеток прикрепляются к твердому покрытию и образуют либо монослой, либо – множество слоев, другие – растут в суспензии. При этом используются перевиваемые клеточные линии («бессмертные» клетки), которые получают от первичных клеточных культур, выделенных из свежих тканей.

Трансформацию рДНК в клетки животных осуществляют двумя подходами:

1) инфицированием – в случае, когда вектором служит геном вирусов животных, способных упаковываться *in vivo*;

2) трансфекцией – в случае, когда трансформируется «голая» молекула рДНК, не способная упаковываться *in vivo*. Трансфекция возможна при использовании специальных методических приемов, например, прямая инъекция рДНК в ядро с целью получения трансгенных индивидуумов.

Из двух подходов наиболее эффективным является первый, так как он обеспечивает почти 100 %-е инфицирование; при втором же способе удается трансфицировать лишь 10–40 % клеток. А интеграция рДНК в геном, например, животных обеспечивается уже только для 0,01 % трансфицированных клеток животных. Для отбора клетки помещают «в культуру», где элиминируются те клетки животных, в которых отсутствует рДНК

(например, $ТК^+$ отбор, когда только клетки грызунов с рДНК могут расти в присутствии тимидина) [127].

*Векторы экспрессии* – это векторы, нуклеотидная последовательность которых определяет уровень экспрессии чДНК. Использование векторов экспрессии проклонированных генов – естественное продолжение их применения при клонировании и определении нуклеотидных последовательностей генов. Манипулирование экспрессией генов – это один из способов лучшего их изучения.

*Искусственные хромосомы* – это:

1) химерные конструкции, полученные на основе бактериофага и плазмиды;

2) векторы, вмещающие фрагмент чДНК размером от 100 kb до 1 Mb и более;

3) так же, как и другие векторы, они содержат уникальные сайты рестрикции, селективные маркеры, последовательности контроля и размножения;

4) низкокопийные конструкции;

5) применяют для:

- клонирования супербольших фрагментов ДНК (библиотека генома);

- переноса генов эукариот в геном высших эукариот с целью получения генеративных трансгенных индивидуумов, обладающих полезными свойствами (например, трансгенные мыши, синтезирующие антитела);

- оказания терапевтических услуг;

6) классифицируют по размеру встраиваемого фрагмента и типу хозяина.

Общей особенностью для искусственных хромосом является то, что в них содержатся центромера, теломеры, точка начала репликации, а также ряд дополнительных последовательностей для облегчения клонирования и экспрессии чужеродного фрагмента ДНК.

**Чужеродный ген.** Молекулярная конструкция гена *in vitro* осуществляется по принципу «распознать → расшифровать → воссоздать → реализовать».

Для получения чДНК необходимо иметь полную информацию о гене, предназначенного для клонирования. При этом био-

логическим руководством для получения чДНК являются молекулярные принципы организации гена *in vivo*.

Источниками для получения чДНК могут служить геномная (выделенная из генома), синтетическая и комплементарная (получают в условиях лаборатории) ДНК [135].

Функционирование экспрессионного аппарата рекомбинантной клетки достигается путем двух методологических приемов, по одному из которых предполагают получение химерного гена, по-другому – гена-эквивалента.

*Химерный ген* – это чужеродный ген, в составе которого содержатся сегменты двойной природы: транскрипционная единица эукариот и регуляторные элементы (регулятор инициации, регулятор терминации) прокариот (рис. 2.8) [28, 103, 135].

Такие химерные гены способны в клетках прокариот эффективно синтезировать эукариотические полипептиды.

Данная методология успешно применяется в получении от клеток *E.coli* многих полипептидов животных (от $1{,}0 \times 10^7$ до $4{,}0 \times 10^8$ единиц активности полипептида на 1 л культуры): гормон роста человека, лейкоцитарный интерферон и др. [28, 103, 135].

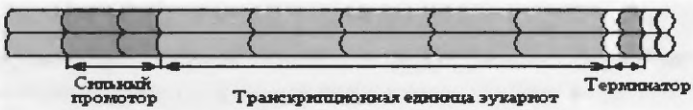



Рис. 2.8. Молекулярная структура чужеродного гена (упрощенная схема): транскрипционная единица эукариот представлена только экзонами

*Ген-эквивалент* – это чужеродный ген, в составе которого содержатся триплеты аминокислот, наиболее часто использующиеся генами прокариот. Экспрессия такого гибридного гена приводит к синтезу химерного белка, содержащего аминокислотную последовательность как бактериального, так и эукариотического белка [18, 53, 58].

**Рекомбинантная ДНК.**рДНК – это искусственно созданная химерная молекула ДНК, содержащая в себе ДНК различного происхождения: рДНК = чДНК + вДНК (рис. 2.7).

Полученные вектор и чДНК (вставка) могут иметь как *«липкие»*, так и *«тупые»* концы. В первом случае для лигирования используют фермент ДНК-лигаза *E.coli*, во втором – ДНК-лигаза Т4. Кроме того, *«тупые»* концы можно преобразовать в «липкие» с помощью линкеров. Линкер – это синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции. При объединении молекул с несовместимыми концами используют адаптеры (одно- или двунитевые олигонуклеотиды). Реакции лигирования проводят в объеме 10 мкл с добавлением 0,5–1,0 мкг векторной ДНК и 30–40 мкг/мл чДНК [6, 36, 146, 193, 194, 237].

### *2.3.2. Перенос рДНК из пробирки в клетку*

Клетки способные поглощать рДНК, называют *компетентными*. рДНК вводят в клетки или вирусные частицы для клонирования и амплификации. Для разных систем хозяин-вектор применяются разные методы (табл. 2.11).

Таблица 2.11

Методы введения генетической конструкции в клетку [20, 127, 196, 202]

| Путь воздействия | Основной приоритет | Метод | Краткая характеристика |
|---|---|---|---|
| *«Пассивный»* | Компетентность индуцируется в активно делящихся клетках с использованием специальных сред, изменением условий культивирования (воздействуют на клетки вначале ледяным (0 °С) раствором $CaCl_2$, затем – высокой температурой (42 °С) в течение 1,5 мин); методом электропорации | | |
| | Для рДНК, сконструированные на основе плазмид | Трансформация клеток *E. coli* путем обработки клеток изолированной ДНК | На отдельных участках клеточной стенки образуются обратимые обнаженные плазматические мембраны, через которые и интегрируется чДНК. Эффективность, зависевшая от бактериального штамма и структуры трансформировавшей ДНК, достигает $10^7$ трансформантов/1 мкг ДНК |

продолжение табл. 2.11

| Путь воздействия | Основной приоритет | Метод | Краткая характеристика |
|---|---|---|---|
| *«Пассивный»* | Для дрожжей с удаленной клеточной стенкой | Трансформация дрожжей | Проводят либо со сферопластами, либо с «литиевыми» клетками: 1–10 мкг ДНК обеспечивает образование от нескольких единиц до нескольких тысяч (от $10^2$ до $10^5$) трансформантов в расчете на $10^7$ клеток. |
| | Для двудольных растений | Кокультивация с агробактериями в жидкой среде | Примерно через 24–48 ч кокультивирования происходит вначале заражение клеток раневой поверхности экспланта, затем встраивание в растительный геном фрагмента Т-ДНК с чужеродным геном |
| *«Активный»* | Для любой гибридной ДНК молекулы | Ферментативный гидролиз клеточных стенок в изотоническом растворе | Для удаления стенки применяют лизоцим, пищеварительный сок виноградной улитки (бактерии), пектиназу или целлюлазу (клетки растений). После гидролиза образуется протопласт (цитоплазма, ограниченная только плазматической мембраной) или сферопласт (фрагментное присутствие клеточной стенки). Недостаток: низкая частота трансформации и трудоемкость процесса |
| | Для трансформации чДНК размером более 100 kb | Электропорация | При кратковременном (15–20 мс для бактерий и 50–55мс – для растений) воздействии электротока высокой напряженности (1–15кВ/см для бактерий и 20–35кВ/см для растений) на клеточную мембрану происходит образование пор (электропробой), через которые в результате осмотических сил рДНК из внешней среды проникает внутрь клетки. О |

продолжение табл. 2.11

| Путь воздействия | Основной приоритет | Метод | Краткая характеристика |
|---|---|---|---|
| | | | проникновении рДНК внутрь клетки свидетельствует увеличение объема клетки. Частота трансформации 80 % |
| *«Активный»* | Для однодольных и двудольных растений | Метод биобаллистической трансформации (прямой метод переноса ДНК) | чДНК вводят в: 1) суспензию растительных клеток (кукуруза, ячмень, банан, виноград); 2) культуры клеток (тополь, ячмень, ель, горох, огурец, клюква, люцерна, зеленый орех); 3) меристематические ткани (рожь); 4) незрелые зародыши (кукуруза, рис, ячмень, пшеница, сорго, просо); 5) пыльцу (табак, пион). Частота трансформации выше для линейных векторов размером не более 10 kb. Частота трансформации зависит от формы (кольцевая или линейная) и размера вектора |
| | Для млекопитающих животных | Метод микроинъекции | Основан на введении генной конструкции в ядерный аппарат сперматозоида или мужской пронуклеус зиготы. Вводимый трансген свободен от вектора (вектор снижает экспрессию до 1000 раз) и имеет линеаризованную форму. Для трансгеноза используется ДНК в концентрации 1–2 мкг/мл, что соответствует 200–400 копиям фрагмента ДНК длиной 5–8 kb в 1 пкл микроинъекционного раствора (приводит к увеличению объема ядра более, чем на 50 %). Частота интеграции ДНК составляет 20–40 % |

продолжение табл. 2.11

| Путь воздействия | Основной приоритет | Метод | Краткая характеристика |
|---|---|---|---|
| *«Активный»* | В медицине при генной терапии (13 % использования); для млекопитающих | Липосомы, как переносчики ДНК | рДНК, заключенные в липосомы предохраняются от воздействия биологических жидкостей, содержащих ферменты. Нагруженные чДНК липосомы сравнительно легко проходят через ткани. чДНК не копируются и не передаются потомству, поэтому метод дает возможность компенсировать генетические дефекты |
| | Для млекопитающих, в медицине (генная терапия) | Перенос генов с помощью ретровирусов (25 %), аденовирусов (28 %), аденоассоциированных вирусов | Трансгеноз в генотип животных осуществляют до имплантационного периода развития на стадии ранней морулы, которые освобождаются от зоны пеллюцида (ZP), подвергаются кратковременному воздействию инфекционным вирусом и трансплантируются самкам-реципиентам. Поэтому трансгенные животные, полученные путем интеграции векторов-вирусов, всегда являются мозаиками с одним или более сайтами интеграции в различных клетках.<br>Преимущества использования вирусных векторов в медицине при генной терапии: ретровирусов и аденоассоциированных вирусов – это стабильное встраивание в геном, аденовирусов – позволяет встраивать крупные фрагменты; недостатки соответственно – инфицирует случайным |

продолжение табл. 2.11

| Путь воздействия | Основной приоритет | Метод | Краткая характеристика |
|---|---|---|---|
| *«Активный»* | | | образом только делящиеся клетки, позволяет встраивать только небольшие фрагменты ДНК, нестабильное встраивание в геном |
| | Для млекопитающих | Трансфекция клеточных линий *in vitro* с последующей пересадкой трансформированных ядер в полость бластоцисты (метод Эванса) | Метод основан на использовании трансформированных генными конструкциями клеточных линий – стволовых и соматических. При пересадке трансформированных бластомер в полость бластоцисты рождаются химеры |

Как видно из табл. 2.11, процесс переноса генетической конструкции может осуществляться путем *трансфекции*, когда вектором служит вирусная ДНК и *трансформацией*, когда вектором служит плазмидная ДНК. Эффективность определяется количеством инфекционных бляшек (при трансфекции) или клонов (при трансформации), приходящихся на молекулу или единицу массы (1 мкг) донорной ДНК. При этом перенос чужеродного гена можно осуществить путем «пассивного» и «активного» воздействия на клетку.

Наиболее широко применяются такие комбинации, когда в роли хозяина выступает штамм *E.coliK12*, а в роли вектора – плазмиды и фаги *E.coli*.

*Требования, предъявляемые к хозяину E.coli*:

1. Быть «идеальным» для амплификации рДНК:

- с целью сохранения целостности рДНК не содержать активную систему рестрикции;

- не содержать элементов, подавляющих репликацию рДНК или мешающих скринингу (отбору).

2. Не должны:

- быть лизогенными, т.е. не должны встраиваться в геном клетки-реципиента, если вектором служит ДНК бактериофага;

- иметь идентичный по отношению к маркерным генам фенотип, если вектором служит плазмидная ДНК.

Процесс введения рДНК в живые клетки *E.coli* называют *трансфекцией*. Клетки становятся проницаемыми для рДНК в присутствии $CaCl_2$. При этом частота трансформации составляет $10^{-3}$, т.е. на каждую 1000 клеток приходится одна трансформированная.

*Эукариотическая система хозяин-вектор.*Как видно из табл. 2.11, клетки эукариот трансформируют путем инфекции или трансфекции с помощью вектора, способного реплицироваться независимо как внехромосомный элемент.

Для трансформации с помощью рДНК и для изучения экспрессии генов используют клетки дрожжей, растений и животных, выращенные в культуре.

На поверхности мембраны пекарских дрожжей *S.cerevisiae* имеется жесткая полисахаридная клеточная стенка, создающий барьер для молекул ДНК. Для введения рДНК дрожжевая клетка, как это показано в табл. 2.11, предварительно обрабатывается либо ферментами в присутствии $CaCl_2$, либо – ацетатом лития.

После введения рДНК *сферопласты* (клетки, лишенные клеточной стенки) переносятся в специальные питательные среды с целью восстановления клеточной стенки. При этом получают $10^4$ трансформированных клеток *S.cerevisiae* на 1 мкг ДНК.

Первичные клеточные культуры высших эукариот, полученные из свежих тканей, имеют ограниченное время жизни. Поэтому из них получают *перевиваемые клеточные линии*, клетки которых по существу бессмертны (каллус растений, раковые клетки грызунов и человека, почек обезьян и др.).

В геном растений чужеродный ген вводится Ti-плазмидой (для двудольных) или методом биобаллистической трансформации (для однодольных растений).

рДНК в клетки животных поступает через инфицирование векторами вирусов животных. В отличие от фага λ упаковка

ДНК вирусов животных всегда происходит *in vivo*. «Голые» же молекулы рДНК вводятся в клетки путем трансфекции.

В клетки многих типов рДНК можно ввести, если подвергнуть смесь клеток и рДНК действию высоковольтного электрического разряда (2–4 тыс. вольт), что сопровождается образованием в мембранах клеток репарируемых отверстий, через которые и проникает рДНК (метод электропорации). При таком методе эффективность трансформации повышается до $10^9$ для плазмид менее 3 kb и до $10^6$ – для плазмид не более 135 kb.

### *2.3.3. Идентификация и отбор клеток с рДНК*

Принцип идентификации и отбора клеток с рДНК зависит от происхождения клеток [28]:

1. В случае с прокариотами (на примере *E.coli*).

1.1. Когда вектором служит плазмида.

Для вектора свойственно то, что он содержит два селективных маркера (гены, выявляющие трансформированные клетки по фенотипу) и поэтому можно провести отбор по трем типам клеток: не трансфецированные, получившие неизменную плазмиду, получившие рекомбинантную плазмиду.

Основной принцип отбора сводится к тому, что при культивировании *E.coli* в средах, содержащие определенный антибиотик, элиминируются клетки, не содержащие рДНК.

1.2. Когда вектором служит бактериофаг.

Для того чтобы отличить сконструированный фаг от не сконструированного, в бактериальные векторы включают сегменты ДНК, содержащие промотор, оператор и ген *β-галактозидазы* (*lacZ*) из *lac*-оперона *E.coli*, благодаря гену *lacZ* при посеве на чашках с агаром, содержащим *Xgal*, появляются голубые бляшки, свидетельствующие о наличии рДНК.

2. В случае с эукариотами на примере культур клеток животных.

После введения рДНК стабильно трансформируется менее 0,01 % трансфицированных клеток животных.

Фенотипический отбор трансформированных клеток животных осуществляют двумя методами: первый основан на применении мутантных реципиентных клеток, второй – нормаль-

ных. Отбор основан на способности клеток с рДНК расти на определенных средах.

### *2.3.4. Клонирование рекомбинантного ДНК*

После определения трансфицированных или инфицированных клеток проводят клонирование рДНК. Клонирующая система, как было отмечено выше, состоит из клетки и рекомбинантной конструкции (рДНК).

Основные принципы, требования и условия клонирования рДНК представлены в табл. 2.12.

Как видно из табл. 2.12, принципы клонирования рДНК зависят от природы векторных молекул, тогда как требования слагаются в независимости от типа вектора, а основные условия для молекулярного клонирования обеспечиваются репликационным, экспрессионным и воспроизводительным аппаратом клетки.

Таблица 2.12

Основные принципы, требования и условия клонирования рДНК [28, 103, 123]

<table>
<tr><th>Принципы клонирования</th><th>Требования к клонированию</th><th>Условия клонирования</th></tr>
<tr><td>При использовании векторов:</td><td>Клетка-реципиент должна:</td><td rowspan="3">Способность к репликации (для чДНК обеспечивается in vitro встраиванием её в вектор, который имеет локус ori – точку начала репликации)</td></tr>
<tr><td>1) плазмидных – трансфицированные клетки высевают на агар для получения колоний</td><td>1) принять только по одной рекомбинантной молекуле<br>2) быть отделена от всех остальных для выделения клона клеток или вирусов, содержащих рДНК</td></tr>
<tr><td>2) фаговых – инфицированные (или трансфицированные) клетки высевают на газоне</td><td>3) отличаться от клеток, не содержащих рДНК</td><td>Наличие ферментативного аппарата (репликационный механизм может работать</td></tr>
</table>

продолжение табл.2.12

| Принципы клонирования | Требования к клонированию | Условия клонирования |
|---|---|---|
| чувствительных клеток, на котором в результате инфицирования соседних клеток образуются фаговые бляшки | 4) не содержать элементов, подавляющих репликацию вектора или мешающих отбору (например, не содержать активную систему рестрикции) | только под контролем соответствующих ферментов ДНК и белков-регуляторов, находящихся в клетке) |
| 3) челночных – клонирование рДНК осуществляют вначале в клетках *E.coli*, а затем ими трансфицируют клетки эукариот | | Воспроизводительный потенциал клетки (в роли клетки-хозяина могут выступать бактерии, дрожжи, клетки эукариот) |

В дополнение к табл. 2.12 следует отметить, что для получения полной или частичной геномной библиотеки проводят общее клонирование всех выделенных фрагментов ДНК. Такой способ клонирования называют шотган (shot-gun) экспериментом.

Далее рассматриваются особенности клонирования рДНК, когда в роли клетки-хозяина выступают бактерии (на примере *E.coli*, *B.Subtilis*), дрожжи (на примере *S.cerevisiae*) и клетки эукариот (на примере высших растений и животных).

**Клонирование в бактериях**

Клонирующую систему бактерий классифицируют на грамположительные (например, *B. Subtilis*, палочкообразные без жгутиков клетки, аэробная почвенная бактерия) и грамотрицательные (например, *E.coli*, палочкообразные со жгутиками клетки, обитатели кишечника теплокровных животных). Для бесперебойной работы клонирующей системы необходимо придерживаться требований, разработанных для вектора клонирования и клетки-хозяина.

***E.coli K12***

Предпочтение, отдаваемое культуре, обусловлено тем, что проведены детальные исследования этого штамма (и его мутантных форм). Штамм является идеальным хозяином для мно-

гих бактериофагов и плазмид и зарекомендовал себя как *«благонадежный клонирующий аппарат»*.

Биотехнологической нишей для *E.coli* является производство негликозилированных белков (фрагменты антител, инсулин, гормон роста).

***B.subtilis***

Основным преимуществом клонирования в бациллах является то, что они способны секретировать рекомбинантные белки. Секретируемый рекомбинантный белок гораздо легче выделить и очистить, чем внутриклеточный, и это почти всегда интактный белок, имеющий уже сформировавшуюся третичную структуру, в то время как для внутриклеточного продукта стадия окончательного формирования пространственной укладки молекулы неизбежно составляет часть процедуры выделения.

Нестабильность плазмид и высокая протеазная активность – это основная трудность, связанная с их использованием в качестве бактерии-хозяина.

Разные виды бацилл заметно различаются между собой по таким параметрам, как температурный оптимум (известно, например, много термофильных штаммов), протеолитическая активность и потребность в кислороде (среди этих организмов есть как облигатные аэробы, так и факультативные анаэробы). Наибольшее распространение получил штамм BR151 (рис. 2.9).

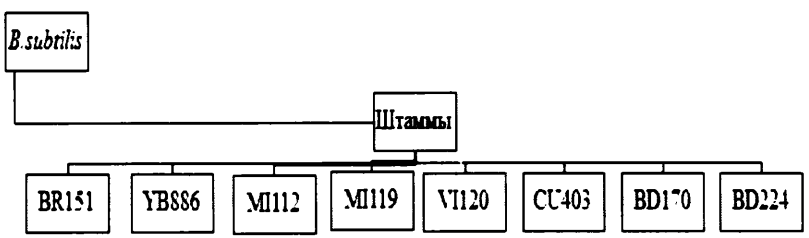



Рис. 2.9. Штаммы *B.Subtilis*, предназначенные для молекулярного клонирования

Почти все стандартные лабораторные штаммы *B. Subtilis* содержат в геноме два профага – PBSX и SPβ. При индукции PBSX функциональные фаговые частицы не образуются: формирующиеся фаги содержат только бактериальную ДНК. SPβ

способен к образованию функциональных частиц, но этот профаг довольно трудно индуцировать. Получены также штаммы, не содержащие в геноме указанных профагов (например, YB886, производный BR151) [179, 189, 222].

В качестве культуральной среды для выращивания бацилл пригодны L-бульон и L-агар. *B. Subtilis* – облигатный аэроб и требует хорошей аэрации на всех этапах культивирования. Нормальная температура инкубации +37 °С.

При работе с *B. Subtilis* применяют трансформацию компетентных клеток и протопластов.

**Клонирование в дрожжах (*S.cerevisiae*)**

Сконструировано большое количество векторных челночных молекул, предназначенных для клонирования вначале в *E.coli*, а затем – в дрожжах. Все эти векторы содержат генетические элементы, обеспечивающие надлежащую селекцию и поддержание плазмиды в хозяине (гены устойчивости к антибиотикам – для клеток *E.coli* и гены биосинтеза – для *S.cerevisiae*) [103, 104, 159, 170, 235].

Трансформированные дрожжевые клетки растят на богатых средах. В качестве источника углерода используют глюкозу. Продолжительность одной генерации для стандартного штамма составляет в среднем 60–90 мин (в жидкой среде при 30 °С).

**Клонирование генотипов высших эукариот**

Из вышеизложенного следует, что клонирование сконструированного гена осуществляется в составе рДНК, в свою очередь, клонирование рДНК – в составе генома клетки (прокариот или эукариот), а клетку – *in vitro* или в составе организма (для многоклеточных эукариот).

Организмы высших эукариот клонируют с использованием соматических клеток, клеток репродукции и эмбрионов.

В биотехнологии различают репродуктивное и терапевтическое клонирование. В первом случае получают целый организм, во втором – воссоздается лишь часть ткани.

Репродуктивное клонирование практически реализуется с целью восстановления исчезнувших и сохранения редких и ценных видов, увеличения численности продуктивных индивидуумов, а терапевтическое клонирование применяется в медицине в целях проведения клеточной терапии.

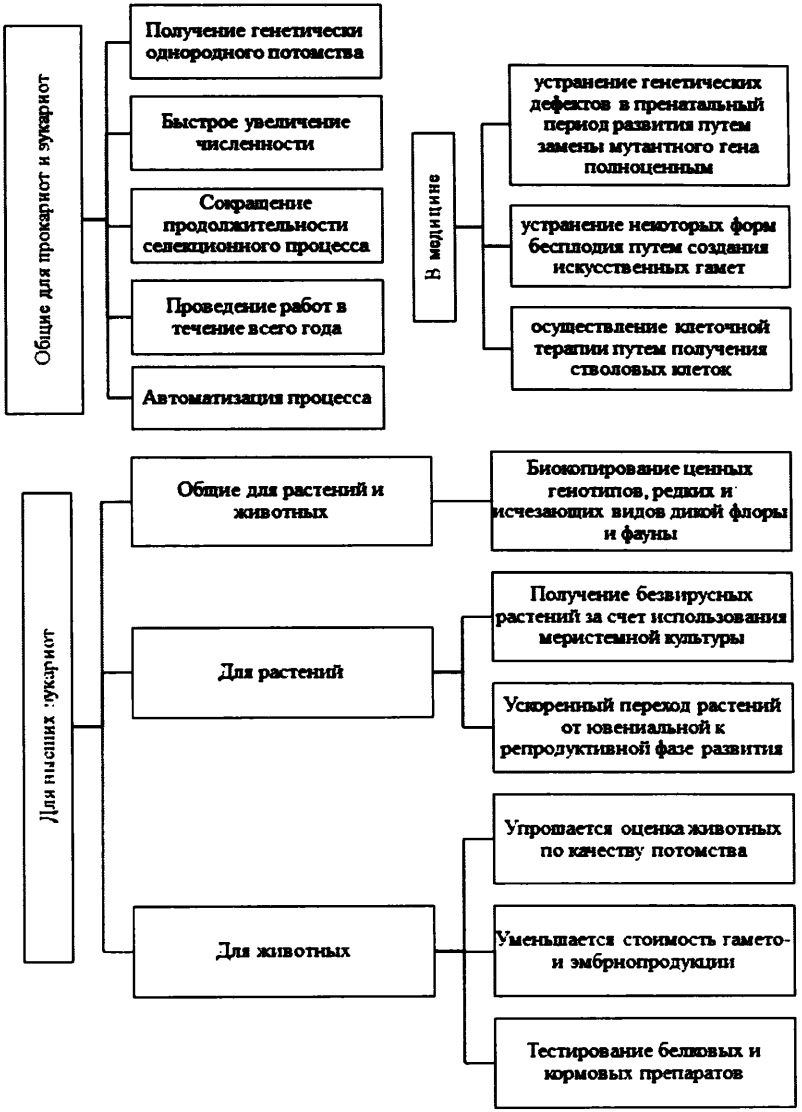



Рис. 2.10. Преимущества метода клонирования генотипов

***Преимущества метода клонирования.*** Клонирование генотипов позволяет:

– в медицине искоренять некоторые виды генетических дефектов;

– в сельском хозяйстве – осуществлять биокопирование ценных и редких генотипов;

- в промышленности – производить сконструированные *in vitro* метаболиты (рис. 2.10).

До 60-х годов XX в. клоны получали искусственным путем исключительно при вегетативном размножении растительных организмов, чаще всего для сохранения сортовых признаков и при получении культур микроорганизмов, используемых в медицине.

В 50–70 гг. были разработаны методы, позволяющие успешно клонировать высшие растения и животных путем выращивания их из отдельных клеток. Так, профессором Стюардом из Корнельского университета, были получены клоны при культивировании отдельных клеток корня моркови в среде с нужным качественным составом, а профессором Гордоном из Оксфордского университета удалось клонировать лягушку путем пересадки ядра, выделенного из клетки кишечника в энуклеированную яйцеклетку.

Разработанные методы клонирования животных требуют совершенствования, так как в процессе экспериментов наблюдается высокая смертность эмбрионов, подвергшихся конструированию. Проблема усугубляется еще и тем, что многие теоретические вопросы клонирования генотипов находятся на стадии изучения.

Благодаря технологии клонирования предполагается появление ускоренной генетической селекции и тиражирования генотипов с исключительными производственными показателями. В сочетании с трансгенозом клонирование генотипов открывает дополнительные возможности для производства ценных биологически активных белков.

### *2.3.5. Скрининг*

Метод идентификации нужного клона из большого числа объектов именуют *скринингом*.

Этот метод основан на том, что чДНК в составе рДНК выражает себя через структурную организацию и функциональное

предназначение. В первом случае для скрининга используют метод отжига с радиоактивным зондом: радиоизотопы -$^{32}$P (период полураспада 14 дней), и серы -$^{35}$S (период полураспада 88 дней), во втором – метод фенотипического отбора (экспрессирующаяся в составе рДНК чДНК придает трансформированной клетке-хозяину специфическое свойство, по которому и осуществляется идентификация).

### *2.3.6. Синтез полипептидов, кодируемых клонированными сегментами эукариотической ДНК*

Синтез белков, предназначенных для проведения различных исследований и применения в медицине, сельском хозяйстве и промышленности, – это одна из самых главных задач, которые ставились при разработке технологии рекомбинантных ДНК.

Производимые методами генной инженерии препараты имеют высокую степень очистки, относительно недороги.

С помощью методов клонирования были синтезированы важные в клиническом отношении белки, которые трудно было получить иным способом. К таким белкам относят интерферон, инсулин и гормон роста человека.

Были синтезированы белки, кодируемые некоторыми вирусами животных (в том числе вирусами человека, такими, как вирус гепатита В) и простейшими (например, *Plasmodiumfalciparum*, возбудителем малярии человека). Они использовались в качестве антигенов в некоторых вакцинах.

### *2.3.7. Банк генов и генотипов*

Различают два типа библиотек генома:

– банк генов,

– библиотека кДНК.

Банк генов содержит все гены данного организма. В данном случае из хромосом конкретного организма выделяют ДНК, подвергают её фракционированию на удобные размеры и полученные сегменты встраивают в векторы клонирования с образованием популяции химерных ДНК. Поэтому векторы, несущие геномную ДНК, называют ещё *клонами геномной или хромосом-*

*ной ДНК.* Созданная библиотека может храниться неограниченно долгое время[155, 221].

Клонирование всего генома называют *«шотган-экспериментом»* [155].

Библиотека кДНК – коллекция клонов кДНК (гены без интронов), получаемых *in vitro* на матрицах мРНК, происходящих из определенной клеточной популяции. Для создания данной библиотеки вначале обнаруживают и выделяют из клеток всю мРНК, которые затем переводят *in vitro* в кДНК для клонирования. Поэтому в библиотеках кДНК представлены продукты экспрессии этих генов в форме мРНК [4, 24, 57].

Создание таких типов библиотек очень важно для изучения процессов развития и дифференцировки.

*Криобанк генотипов.* На базе многих лабораторий осуществляется процесс криосохранения генетических ресурсов. В таких лабораториях создаются коллекции замороженных клеток прокариот и эукариот в жидком азоте при температуре -196 °С.

Задачи криобанка – сбор и длительное (десятки лет) сохранение биологического материала, несущего полную генетическую информацию различных видов организмов, в первую очередь редких и исчезающих. В настоящее время в криобанках содержатся как отдельные гены, так и целые генотипы (репродуктивные и соматические клетки эукариот, клетки прокариот). При этом клетки сохраняют жизнеспособность, и после размораживания их можно использовать для получения полноценных живых организмов.

## 2.4. Основы конструирования генотипов высших эукариот

Производственным дополнением к умению выращивать сельскохозяйственные культуры растений и породы животных является сельскохозяйственная биотехнология, которая обеспечивает эффективность процессов селекционных преобразований генотипов с помощью передовых технологий конструирования генотипов *in vitro*.

Для повышения их продуктивных и улучшения резистентных качеств в сельскохозяйственной биотехнологии успешно развиваются такие технологии, как гибридизация, клонирование и трансгеноз.

### 2.4.1. Протопластная технология

Протопластная технология конструирует генотип растений путем гибридизации целых клеток и отдельных фрагментов разных клеток [20, 35, 196, 216, 219, 224].

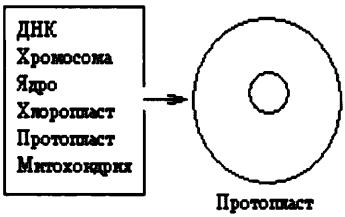



Рис. 2.11. Блок-схема получения растений с заданными признаками на основе протопластной технологии

В первом случае гибридизации подвергаются две протопласты (клетки, лишенные клеточной стенки), полученные от разных растений, во втором – родительская клетка реконструируется путем введения в нее изолированных клеточных органелл (ядро, хлоропласт, митохондрии; рис. 2.11).

Практическая ценность протопластной технологии основана на создании новых форм хозяйственно важных сортов растений [20].

В целом технологический принцип основан на получении протопластов и их объединении с целью регенерации целых растений с заданными свойствами и признаками (рис. 2.12) [20].

*Получение протопластов* [20, 35, 196]. Способы получения растительных протопластов: ферментативный и механический. В первом случае на растительную клеточную стенку воздействуют ферментами (пектиназа, целлюлаза, гемицеллюлаза), во втором – микрохирургическим скальпелем.

Факторы, влияющие на успешное выделение протопластов:

1) эндогенные – тип ткани (лист, семядоля, корень, пыльцевые зерна, каллус, клеточная суспензия), вид, сорт, возраст и физиологическое состояние растения;

2) экзогенные – качество и состав ферментов, pH-среды, вид осмотика (сахароза, маннит, сорбит).

Для получения жизнеспособных протопластов с высокой метаболической активностью необходимо придерживаться следующих ключевых условий:

1) по использованию генотипов: молодые растения или суспензионные культуры на поздних стадиях логарифмической фазы роста;

2) при выполнении протопластной технологии:

– стерилизацию исходной ткани осуществлять 70 %-м этанолом, 10 %-м раствором гипохлорита кальция и др.,

– строгое соблюдение условий применения (изотонический или гипертонический с pH 5,4–6,2) и времени воздействия (минимальное) ферментных препаратов, а также условий выделения протопластов (на рассеянном свету или в темноте);

3) для успешной дальнейшей технологии полученные протопласты должны быть:

– очищены от остатков неразрушенной ткани (центрифугирование при 100–200g) и отмыты от ферментов,

– обеспечены благоприятными условиями культивирования (изотонический качественный состав питательной среды, аэрация; благоприятный температурный режим, который высоко вариабелен – от 10–14 °С (например, 14 °С для пшеницы) до 30–32°С (например, 27 °С для томатов).




Рис. 2.12. Блок-схема выделения, культивированияи регенерации растений из протопластов

Существенным отличием сред для культивирования протопластов является добавление осмотиков (0,4–0,8М) и увеличение концентрации кальция до 2–4 раз.

Методы определения жизнеспособности протопластов основаны на тестировании с определенными красителями (например, флуоресцеиндиацетат – ФДА) или ультрафиолетом. Жизнеспособные протопласты в первом случае расщепляют краситель *эстеразами*, а во втором – становятся визуально различимыми по зеленому свечению.

Качество суспензии протопластов определяется процентом жизнеспособных протопластов путем подсчета их в камере Фукса-Розенталя. В среднем, плотность протопластов (количество в 1 мл суспензии) должна составлять 1–5 х $10^6$ клеток/мл, а объем культуры – 2,5–10 мл.

Процесс *слияния протопластов* осуществляется по схеме: слипание – слияние. Протопласты имеют отрицательный поверхностный заряд. Поэтому слияние протопластов индуцируют химическим и физическим методами. Первый метод основан на использовании специальных химических соединений (например, полиэтиленгликоль – ПЭГ), второй – переменного тока (600 В/с в течение 10–20 мкс; метод электрослияния).

*Регенерация растений в культуре протопластов* [20, 35, 196]. В процессе культивирования жизнеспособные протопласты регенерируют клеточную оболочку и превращаются в обычную культивируемую *in vitro* клетку. Процесс характеризуется синтезом предшественников целлюлозы и пектиновых веществ.

Регенерация сконструированной протопластной системы во времени сводится к:

– образованию клеточной стенки (10–30 мин), густой сети (24 ч) и первого деления (24–36 ч);

– формированию колоний каллусных клеток (3–4 недели: для увеличения скорости деления постепенно снижается осмотическое давление);

– пересадке каллуса на агаризованную среду.

Индукция морфогенеза (стеблей и корней) и эмбриоидогенеза в каллусе приводит к образованию растений-регенерантов.

### *2.4.2. Соматическая гибридизация*

Метод гибридизации соматических клеток осуществляют на уровне растений и животных. В медицине, для получения моноклональных антител, производят слияние антителообразующей клетки (В-лимфоцита) с опухолевой, в результате образуется *гибридома*, способная к неограниченному росту вне организма с сохранением способности продуцировать антитела.

Слияние протопластов соматических клеток растений (дополнительно с искусственным конструированием генотипа) приводит к получению гибридного организма, что позволяет [20]:

*во-первых*, преодолевать ограничения полового процесса, так как при данной технологии возможно:

– скрещивание филогенетически отдаленных видов растений;

– получение асимметричных гибридов, несущие генетические детерминанты различных генотипов;

– создание систем гибридизации, одновременно включающих три и более генотипов;

*во-вторых*, преодолевать филогенетические ограничения, налагаемые генеративными системами несовместимости, так как позволяет скрещивать формы растений, несущие:

– аномалии в морфогенезе или гаметогенезе;

– различные эпигенетические программы;

*в-третьих*, получать гибриды, гетерозиготные по внеядерным генам.

При соматической гибридизации осуществляют до 30 различных вариантов продуктов слияния, к широко практикуемым можно отнести:

1. Ядерный гибрид – истинная гибридная клетка со слившимися ядрами.

2. Гетерокарион – генотип без процесса слияния ядер.

3. Субпротопласт – *«сложный»* протопласт с некоторыми органеллами клетки: нуклеопласт + протопласт + цитопласт.

4. Цибрид – генотип, несущий хромосомы только одного из родителя, а экстрахромосомы обеих или только одного.

5. Цитогет – генотип, несущий альтернативные цитоплазматические гены от обоих родителей (цитоплазматические гетерозиготы)

Таким образом, выделение, культивирование, слияние протопластов и перенос в них отдельных органелл позволяет генетикам и селекционерам виртуозно расширять разнообразие получаемых химер.

### *2.4.3. Клонирование генотипов растений*

Для генотипа растений, клонирование – это обычный процесс, так как клетки не теряют тотипотентности.

Клонирование генотипов растений основано на применении меристематической (образовательной) ткани (недифференцированная, свободная от инфекции ткань растений) [20, 35, 196]. Клетки меристемы способны многократно делиться, дифференцироваться и давать начало всем тканям и органам растений.

Технология клонирования растений складывается из этапов, представленных на рис. 2.13, а методы охарактеризованы в табл. 2.13.

Как видно из рис. 2.13, блок схема клонирования генотипов растений складывается из четырех этапов, в конце первого этапа формируются первичные побеги, второго – получают максимальное количество мериклонов, третьего – укоренение микропобегов в питательной среде с ауксинами, четвертого – рост растений на почве в горшке в теплицах.

Следует отметить, что пробирочные растения пересаживают весной и ранним летом. Растения после изъятия из колб и отмывки от остатков агара высаживают в почву с горшком.

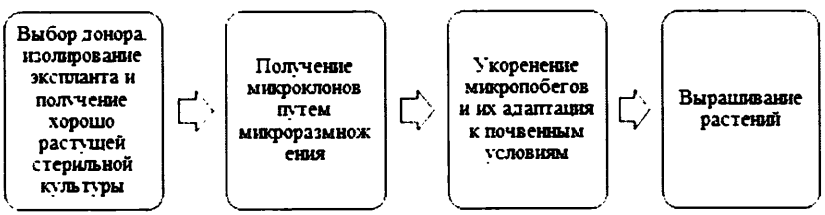



Рис. 2.13. Блок-схема технологии клонирования генотипов растений

Таблица 2.13

Методы клонирования [20, 35, 196]

| Метод | Технологический принцип | Применение |
|---|---|---|
| Активация развития существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки, интеркамерные зоны стебля) | удаление верхушечной меристемы стебля с последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на среде с гормонами цитокининов (способ 1) или без гормонов (способ 2) | при производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных технических (сахарная свекла, табак), овощных (картофель, томаты), плодовых (яблоня, вишня) и ягодных (малина) культур, для размножения культур промышленного цветоводства (азалия) и древесных растений (береза) |
| Индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта | основан на способности растений к регенерации: на средах, содержащих цитокинин с ауксином в соотношении 10:1 | из любых органов и тканей растения (искл. сосна) |
| Индукция соматического эмбриогенеза | в два этапа: клетки экспланта дифференцируются в присутствии ауксинов в эмбриональные, затем в эмбриоиды после уменьшения концентрации ауксинов | в тканях первичного экспланта или в каллусных культурах |
| Дифференциация адвентивных почек | в первичной и пересадочной каллусной тканях | применим для растений, каллусные ткани которых отличаются генетической стабильностью (томат, спаржа, некоторые древесные породы) |

Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20–22 °С), освещенностью (5 тыс. лк) и влажностью (65–90 %) и искусственным туманом. Через месяц после посадки для дополнительной подкормки растений применяют минеральные удобрения. По мере роста растений их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом. Процесс адаптации пробирочных растений к условиям почвы протекает сложно, что нередко приводит к гибели [20, 35, 196].

На рис. 2.14 показана блок-схема клонирования растений методом активации развития существующих в растении меристем.

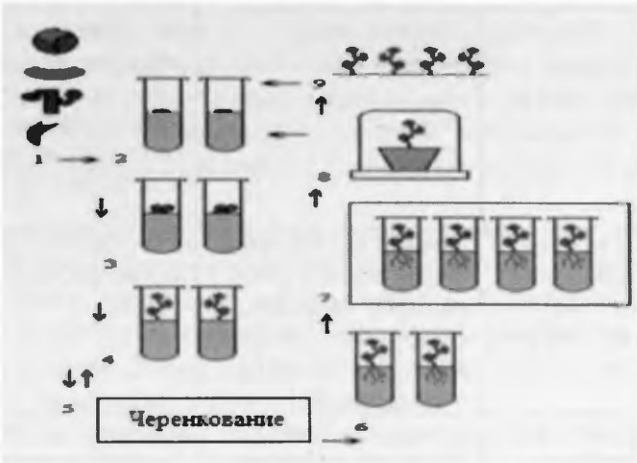



Рис. 2.14. Блок-схема клонирования растений методом активации развития существующих в растении меристем:

*1 – выбор исходного экспланта; 2 – получение стерильной культуры; 3 – образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте; 4 – рост почек и формирование микропобегов; 5 – размножение микропобегов (черенкование); 6 – укоренение микропобегов; 7 – депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре; 8 – перевод растений в тепличные условия; 9 – высадка растений-регенерантов в поле*

Таблица 2.14

Факторы, влияющие на клональное микроразмножение растений [20, 35, 196]

| Происхождение | Фактор | Характеристика |
|---|---|---|
| Эндогенное | Генотип исходного растения | двудольные травянистые растения обладают более высоким коэффициентом размножения. Растения, хорошо размножающиеся вегетативно, обладают более высокой регенерационной способностью *in vitro* |
| | Возраст исходного растения | Зрелые зародыши, 20–30-дневные проростки или различные их части обладают высокими морфогенетическими потенциями по сравнению с тканями взрослых растений |
| | Сезонность изоляции экспланта | Более рентабельно применять ткани и органы, изолированные в момент вегетации растений |
| | Размер первичного экспланта | Чем меньше эксплант, тем меньшей регенерационной способностью он обладает, и наоборот. Оптимальный размер первичного экспланта варьирует в пределах от 0,1–0,2мм (хмель) – 0,5–0,8мм (лук, чеснок) до 2 мм(малина) |
| Экзогенное (питательная среда) | Качественный состав | Подбирают для каждого вида |
| | Гормональный баланс (соотношени цитокинин – ауксин) | Приводит к индуцированию корнеобразования (низкое), каллуса (среднее), к развитию пазушных меристем или адвентивных почек (высокое) |
| | Физические условия | Для повышения коэффициента размножения растений следует каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания подбирать индивидуальные условия культивирования |

Как видно из рис. 2.14, процесс складывается из таких работ, как выбор исходного экспланта, получение стерильной культуры, образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте, рост почек и формирование микропобегов, размножение микропобегов (черенкование), укоренение микропобегов, депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре, перевод растений в тепличные условия и высадка растений-регенерантов в поле.

На клональное микроразмножение растений влияют различные факторы, основные из которых представлены в табл. 2.14.

Как видно из табл. 2.14, на клонирование влияют факторы по природе:

– эндогенные (генотип, возраст, стадия развития, морфологическая особенность);

– экзогенные (качественный состав питательной среды, гормональный баланс, физические условия).

### *2.4.4. Конструирование генотипов животных*

С целью конструирования генотипа животных практикуется два вида микротехнологий – это внутривидовое и межвидовое. В первом случае получают клонированные, во втором – химерные генотипы животных.

Необходимым условием для клонирования животных является подготовка двух генетических программ: хромосомальную ДНК в составе ядерного аппарата клетки и митохондриальную ДНК в составе цитопласта, т.е. энуклеированной яйцеклетки (оплодотворенная яйцеклетка с изолированным ядерным аппаратом). Важное условие для получения кариопласта – яйцеклетка должна пройти стадию метафазы II мейоза. Для этой фазы характерна высокая активность фактора М-фазы (MPF) [2, 11].

**Клонирование генотипов животных**

При клонировании генотипов животных используют два метода – клонирование бластомер предимплантационного эмбриона и клонирование ядер соматических клеток (табл. 2.15).

Как видно из табл. 2.15 и рис. 2.15, клонирование генотипов животных достигается в результате переноса изолированного из эмбриона бластомера в оплодотворенную энуклеированную яйцеклетку.

Таблица 2.15

Клонирование генотипов [38, 39, 127, 128]

| Показатель | Метод | |
|---|---|---|
| | дисекции эмбриона | пересадки ядер |
| Основа | технология разделения эмбриона на ранних стадиях дробления на отдельные бластомеры | пересадка ядер, выделенных из соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки |
| Технология | получение эмбрионов на ранних стадиях дробления → удаление зоны пеллюцида (ZP) → разделение эмбриона на отдельные бластомеры → инъецирование выделенных бластомеров в энуклеированную яйцеклетку → введение сконструированного эмбриона в небольшой цилиндр агара → культивирование *in vivo*→ пересадка «сконструированного» эмбриона реципиентам | извлечение и подготовка овулировавшей яйцеклетки → помещение ядер, выделенных из соматической клетки (или бластомера эмбриона) животных в *«энуклеированную»* яйцеклетку → слияние ядра с цитоплазмой ооцита с помощью вируса Сендай или электрического тока → заключение эмбрионов в агар → культивирование → пересадка *«сконструированного»* эмбриона реципиентам |
| Образуемый генотип | монозиготные | клонированные |
| Успех в получении заданного генотипа зависит от | Правильного удаления зоны пеллюцида и от эффективности инкубационного периода после микрохирургического вмешательства | Перехода ядра из «узко специализированного» дифференцированного состояния в тотипотентное (*«репрограммирование»* ядра) |

Первые монозиготные животные среди сельскохозяйственных животных получены в 1979 г. у овец путем разделения 2-х бластомерных эмбрионов.




**Рис. 2.15. Упрощенная схема конструирования монозиготных эмбрионов**

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) характеризуются двумя полезными качествами – неограниченным воспроизведением и универсальностью.

Полученные *in vitro* яйцеклетки и эмбрионы используются для клонирования вследствие большей практичности и надежности.

Следует отметить, что для эмбрионов большинства животных после компактизации морулы защита со стороны ZP несущественна. Поэтому последующие разработки по получению монозиготных животных были направлены на использование поздних морул и бластоцист. В этом случае эмбрионы разделяют на две равные части одновременно с разрезом ZP. В таком состоянии эмбрионы пересаживают в репродуктивный тракт реципиентов.

Как видно из табл. 2.15 и рис. 2.16, технология клонирования позволяет вмешиваться в генетическую организацию клеток животных.




Рис. 2.16. Технология клонирования животных методом энуклеации ядер соматических клеток и пересадка их в пустую ZP [141]

К настоящему времени накоплен большой опыт по оптимизации условий пересадки ядер соматических клеток в яйцеклетки (ооциты).

Активность процесса репрограммирования, покоющегося на фазе Go/G1 ядра, оптимально протекает между метафазой II и телофазой II ооцита (время, когда ооцит пригоден для пересадки ядра, жестко ограничено).

Значительный вклад в решение проблемы клонирования был сделан шотландской группой исследователей из Рослинского института и компании «PPL Therapeuticus» под руководством Яна Вильмута (Wilmut). Именно ими в 1997 г. получена овца по кличке Долли – первое млекопитающее, сконструированное из ядра взрослой соматической клетки: собственное ядро ооцита было заменено на ядро клетки из культуры эпителиальных клеток молочной железы взрослой лактирующей овцы. В дальнейшем были проведены успешные эксперименты по клонированию различных млекопитающих с использованием ядер, взятых

из взрослых соматических клеток животных (мышь, 1997; корова, 1998; кошка, 2001; кролик, 2002; олень, 2003; собака, 2005).

Основным ограничением для клонирования соматических ядер является: соматическая клетка способна делиться не более 50 раз, после чего в ней протекают необратимые процессы, ведущие к старению и гибели клетки.

При получении клонов путем пересадки ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки, возможно, что у такого организма будут протекать процессы жизнедеятельности в ускоренном биологическом темпе (на примере овечки Долли), что приведет в конечном итоге, к наступлению преждевременной старости и смерти.

Практические трудности, стоящие перед клонированием, не позволяют данной методике глубже войти в нашу жизнь, так как:

1. Технология несовершенна, выход удачных случаев чрезвычайно мал.

2. Имеет место массовая гибель эмбрионов, подвергшихся конструированию. До стадии морулы и бластулы развивается всего от 10 до 30 % эмбрионов. Многие эмбрионы погибают и на более поздних стадиях развития (в постимплантационный период). Живыми рождаются лишь единицы, не более 1–2 % от числа использованных для конструирования эмбрионов.

Следует отметить, что воспроизвести точную копию генотипа животных очень сложно вследствие того, что в процессе индивидуального развития организма структурно-функциональные изменения высоко вариабельны.

**Технология получения химерных генотипов.** *Химера* – это индивидуум, в организме которого совместно присутствуют клетки более чем одного генотипа.

Исходя из определения различают абсолютных и частичных химер: в первом случае химера сконструирована в результате объединения бластомер, выделенных из разных эмбрионов; во втором – при трансплантации органа или ткани [90], когда в организме функционирует чужеродный по генотипу орган (или ткань).

На рис. 2.17–2.18 и в табл. 2.16 дана краткая характеристика методов получения химерных генотипов [38, 39].

Таблица 2.16

Краткая характерстика методов получения химерных генотипов

| Показатель | Метод | |
|---|---|---|
| | агрегационный | инъекционный |
| Метод основан | на объединении двух или более бластомер разных генотипов в один эмбрион (рис. 2.17) | на введение в полость бластоцисты бластомеров из другого эмбриона (рис. 2.18) |
| Используют эмбрионы разных генотипов на стадии | Раннего дробления: от 4–8 бластомер до ранней морулы | Позднего дробления: бластоцисты |

Для инъекционного метода имеются некоторые преимущества по сравнению с агрегационным методом: не требует удаления ZP, применяют для получения межвидовых химер.




Рис. 2.17. Упрощенная блок-схема получения химерных генотипов агрегационным методом




Рис. 2.18. Упрощенная схема получения химерных эмбрионов инъекционным методом

Таким образом, в процессе получения химер не происходит гибридизации клеток. Химерные животные поддерживают хозяйственно важные признаки лишь на протяжении одного поко-

ления и не передают потомкам характерную для них генетическую мозаичность.

### *2.4.5. Принципы конструирования трансгенных генотипов*

Модельными объектами в биотехнологии растений являются табак, томаты, петуния среди двудольных и рис, кукуруза – среди однодольных, в биотехнологии животных – мышь и кролик.

Факторы, оказывающие влияние на интеграцию и экспрессию трансгена у макроорганизмов показаны в табл. 2.17.

Таблица 2.17

Факторы, влияющие на интеграцию и экспрессию трансгенов у макроорганизмов [20, 38, 127, 143, 196]

| Показатель | Трансгенный генотип | |
|---|---|---|
| | растений | животных |
| Процент трансформации | до 60 % | 0,5 % |
| Форма интегрируемой молекулы ДНК | – линейные фрагменты ДНК интегрируются чаще, чем кольцевые плазмиды;<br>– число интегрировавшихся копий на клетку: от 1 до 500;<br>– коммерчески перспективно включение одной копии | |
| Биологически обусловленный временной интервал | создание одного нового генетически модифицированного сорта растения стоит от 50 до 300 млн. долларов и занимает от 6 до 12 лет | требуется примерно три поколения (примерно 10 лет), чтобы новый генотип стал пригодным для масштабного распространения |
| Возрастная категория индивидуумов | технологически «привлекательным» считаются | |
| | молодые | физиологически зрелые |

Первый трансгенный макроорганизм получен среди животных в 1976 г. (мышь), среди растений – в 1983 г. (табак). К настоящему времени уже получены среди сельскохозяйствен-

ных растений более 160 видов трансгенных растений и более 50 видов трансгенных животных.

Создание трансгенных генотипов направлено на получение:

1) сортов растений: с более высокой урожайностью, дающих несколько урожаев в год, токсичных для некоторых видов вредителей, устойчивых к неблагоприятным климатическим условиям и способных синтезировать некоторые белки животного происхождения [20, 196];

2) пород животных: высокопродуктивных, скороспелых, резистентностойких и способных синтезировать терапевтически значимые полимеры [38, 39, 127, 128].

Преимущества получения трангенных генотипов:

1) для животных теоретически можно ожидать следующие результаты: при клонировании животных молочную продуктивность коров можно увеличить на 20–25 %, мясную на 30 % и шерстную на 20 %, при трансгенозе – на много больше [38, 39, 127, 128];

2) для растений: применение инсектицидных трансгенных генотипов растений может повысить чистый доход на 35 %, дать в год почти 670 млн. дол. прибыли и снизить количество пестицидов почти на 50 млн. т в год. Это в свою очередь на 632 млн. долл. в год уменьшит сумму на охрану окружающей среды, снизит количество заболеваний, прямо или косвенно вызванных пестицидами, и сэкономит здравоохранению 37 млн. долл. [20, 196].

Площади, занятые трансгенными растениями, стремительно возрастают: с 1,7 млн. га в 1996 г., когда началось их возделывание в коммерческих масштабах, до 60,0 млн. га в 2002 году, что составляло около 4,5 % от всех пахотных площадей в мире. Причем 99 % этой площади занимают четыре культуры: соя, хлопок, кукуруза и рапс. По этим растениям картина еще более впечатляющая – в среднем 22 % их насаждений занимают трансгенные сорта. В настоящее время в США около 75 % хлопка и сои, в Аргентине – 99 % сои, в Канаде – 65 % рапса, в Китае – 50 % хлопка являются трансгенными [20, 196].

Интенсивность и эффективность работ по трансгенозу высших эукариот сдерживается определенными лимитирующими факторами, основными из которых являются следующие:

1. Полигенный тип наследования большинства хозяйственно-полезных признаков сельскохозяйственных растений и животных. Трудно одновременно вводить в геном высших эукариот несколько функциональных генов больших размеров (каждые более 10 kb).

2. Нестабильность аппарата экспрессии трансгена в геноме трансгенного организма. Часто после двух – пяти поколений активно транскрибирующийся трансген вследствие «чуждого для реципиента метаболизма» перестает экспрессироваться.

3. Крайне медленное развитие исследований по идентификации эффективных генов, созданию генетической конструкции и банков генов.

В любом деле имеются положительные и отрицательные стороны. Получение трансгенных макроорганизмов не исключение. Увеличение продуктивности и повышение резистентности – с одной стороны, влияние на естественное биоразнообразие и нарушение естественной генетической вариации – с другой стороны – это два противоречивых полюса конструкторской технологии генотипов, направленных на получение трангенных индивидуумов.

По характеру локализации трансгена в организме трансгенные животные могут быть генеративными и соматическими (табл. 2.18).

Из табл. 2.18 следует, что соматические трансгенные животные выступают как биореакторы синтеза ценных белков, а генеративные – для увеличения селекционных признаков и повышения резистентности.

**Основы генной терапии в медицине**

Генная терапия – процедура, направленная на искоренение генетических дефектов и борьбу с инфекционными агентами, основанный либо на введение в соматические клетки организма терапевтических генов, либо для первого – замену мутантного гена *«нормальным»* [16, 204, 230].

Для доставки терапевтических генов используют такие векторы вирусного происхождения, как ретровирусы и аденовирусы.

По способу доставки вектора в поражённые клетки генная терапия может осуществляться *ex vivo* и *in situ*.

Таблица 2.18

Биология генеративных трансгенных генотипов животных [46, 72]

| Показатель | Трансгенный генотип | |
|---|---|---|
| | генеративный | соматический |
| Получение | В ядро сперматозоида или зиготы вводят искусственную генетическую конструкцию. После инъекции способны к развитию от 1 до 10% зигот. Интегрированный в геном трансген локализуется во всех клетках организма | Путем инъекции на ткани и органы половозрелого организма. Технология отличается простотой исполнения, малой трудоемкостью. Для инфицирования достаточного числа клеток следует использовать большую дозу ретровирусов |
| Уровень экспрессии трансгена | Зависит от места интеграции и числа копий. Экспрессия чДНК носит тканеспецифический характер, может приводить к изменению фенотипа животных | Низкий. Трансген локализуется только в трансформированных тканях и органах. При этом трансформация носит мозаичный характер |
| Передача трансгена потомству | Передают. Время получения результатов зависит от генерационного интервала | Не передают. Результаты получают непосредственно после введения генетической конструкции |

В первом случае пораженные клетки выделяют из организма пациента, инкубируют с вектором, после чего генетически изменённые клетки вносят в организм. Наиболее часто метод применяют в отношении клеток крови, что связано с простотой их выделения и последующего обратного введения.

Во втором случае вектор вводят непосредственно в поражённые ткани. В настоящее время испытывается технология проведения генной терапии *in vivo*. В этом случае вектор планируется вводить в кровоток. Такой подход более удобен и прост, поэтому его считают наиболее перспективным.

Следует отметить, что проводимые в настоящее время клинические эксперименты находятся на начальных стадиях испытаний генной терапии, вовлекающие очень ограниченное число пациентов. Генетическая корректировка дефектов разрабатывается применительно к заболеваниям, несущие тяжелые необратимые для здоровья последствия и связанные с новообразованиями (злокачественные опухоли), физиологическими (ишемическая болезнь сердца) и биохимическими расстройствами (аутоиммунные расстройства), а также инфекциями (например, ВИЧ-инфекция/СПИД).

**Заключение**

Резюмируя следует отметить, что молекулярные технологии *in vitro* заняли прочную позицию в сельском хозяйстве благодаря «эксклюзивным» особенностям макроорганизмов, к наиболее важным из которых можно отнести:

*1. Для растений:*

1) регенерация фертильных растений из одной клетки или их протопластов;

2) природная система трансформации растений Ti(Ri)-плазмидами агробактерий и создание на их базе векторов, способных интегрироваться в хромосомы растений.

*2. Для животных:*

1) предимплантационное развитие эмбриона, благодаря которому можно их извлекать из репродуктивного аппарата матери;

2) возможность проведения микроклеточных (трансгеноз, клонирование) и макроклеточных (культура клеток, криобиотехнология) технологий на уровне клеток репродукции и эмбрионов.

Успех в проведении молекулярных технологий в сельском хозяйстве определяется фундаментальными исследованиями, направленными на изучение вопросов, связанных с регенерацией и на разработку методов культуры клеток и микрохирургии.

На реализацию у трансгенных организмов биологических качеств биотехнологического происхождения оказывают влияние ряд факторов, наиболее важными из которых являются: метод проведения трансгенной технологии, пути интеграции трансгена, наследование трансгена.

Контрольные вопросы

1. Что чужеродная ДНК собой представляет – фрагмент, ген или сегмент?

2. Какими методами получают чДНК? На Ваш взгляд, по какой из методик проще получить чДНК?

3. Опишите функции чДНК, выполняемые ею в составе рекомбинантного ДНК.

4. Из каких процедур складывается технология рДНК? Какие ферменты используются при конструировании рДНК?

5. Какими «биологическими правилами» следует руководствоваться при конструировании новых генетических и биологических программ развития?

6. Имеются ли общие принципы при конструировании клонированных и химерных генотипов растений и животных?

# 3. ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Фундаментальные основы клеточной биотехнологии в рамках данного учебного пособия не рассматриваются ввиду ограничения объема, поэтому обучающемуся следует обратиться к другим источникам, указанных в библиографическом списке литературы.

Прикладные основы клеточной биотехнологии рассматриваются в рамках использования знаний для переработки сырья и решения экологических проблем предприятий.

Пусковым механизмом для развития макро- и микротехнологий на уровне клеток служит метод культивирования, обеспечивающий сохранение жизнедеятельности изолированных клеток, так как метод основан на способности клеток к существованию и размножению *in vitro* или *ex situ*.

При культивировании клеток следует различать два существенно различающихся между собой подхода:

– в первом случае – это *in vivo* (от лат. *«в живом»)* и *in vitro* (от лат *«в стекле»),*

– во втором – это *in situ* (от лат. *«на месте»*) и *ex situ* (от лат. *«не на месте»*).

*Культивирование* – метод выращивания выделенных клеток в питательной среде.

Культивирование обеспечивает производство, с одной стороны – биомассы, с другой – метаболитов.

Культивирование основано на знаниях о биологических особенностях клеток, их физиологического и биохимического состояния и понимании значения физико-химических условий среды для их жизнедеятельности [1, 3].

Преимущества культивирования, условия и правила работы с культурой клеток представлены в табл. 3.1.

Как видно из табл. 3.1, преимущества культивирования клеток проявляются в научном и прикладном (коммерческом) аспекте.

Таблица 3.1

**Преимущества культивирования, условия и правила работы с культурой клеток**

| Преимущества культивирования клеток | | Условия и правила работы с культурами клеток |
|---|---|---|
| Научные | Коммерческие | |
| Наглядное прижизненное наблюдение за клетками | Автоматизация процесса | Стерильность и строгое соблюдени правил асептики |
| Возможность применения экспериментальных методик с целью изучения влияния самых различных факторов | Оптимизация условий культивирования суспензии клеток | Культуры разных генотипов и физиологического состояния требует питательной среды строго определенного состава |
| Получение результатов при использовании небольшого количества клеток (примерно 10 г, т.е. $10^2$–$10^6$ клеток) | Интенсификация процессов в заданной программе | Следует соблюдать определенные условия выращивания: световой, температурный и газовый режимы |
| Более глубокое проникновение в механизмы роста и дифференцировки клеток | Получение культур не зависит от сезона, климатических и географических условий | При работе следует проводить жесткий контроль качества клеток после применяемых *in vitro* технологий |
| Доступность широкого набора мутантных клеток | Возможность получения первичных и вторичных метаболитов | Лаборатория при работе с культурами клеток должна быть оснащена необходимыми оборудованиями и приборами, к основным из которых относят ламинарный бокс, микроскоп, стерилизатор (автоклав), термостат и многое другое |
| Способность клеток к росту в культуре привела к развитию методов хранения, клонирования, слияния клеток и трансгеноза | Экономия посевных площадей | |

### 3.1. Особенности роста клеток в культуре

Для клеточных культур характерно прохождение таких фаз, как лаг, экспоненциальная, стационарная, разрушительная.

Основные фазы роста культивируемых клеток показаны на рис. 3.1 и охарактеризованы в табл. 3.2.




Рис. 3.1. Схема логарифмической фазы роста культивируемых клеток: *лаг (I); экспоненциальная (II); стационарная (III) и разрушительная (IV) фазы*

Таблица 3.2

Логарифмическая фаза роста культивируемых клеток

| Фаза | Поведение клеток | Синтез метаболита |
|---|---|---|
| Лаг-фаза | Отсутствует рост числа клеток и образование продуктов | Период адаптации (индукции): реорганизация метаболизма клетки |
| Экспоненциальная фаза | Быстрое накопление биомассы | Накопление первичных метаболитов (нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы) |
| Стационарная фаза | Режим постоянства общего числа клеток (равновесие между числом образующихся и гибнущих клеток) | Накопление вторичных метаболитов (витамины, антибиотики; алкалоиды, стероиды, масла, пигменты) |
| Фаза отмирания клеток (полный лизис клеток) | Возрастает число погибших клеток в связи с истощением питательности и накоплением продуктов метаболизма | Удаляя продукты метаболизма или заменяя питательную среду устраняют переход популяции в фазу отмирания |

Как видно из рис. 3.1 и табл. 3.2, для биотехнологических целей стратегически важными являются *экспоненциальная фаза* – фаза синтеза первичных метаболитов и *стационарная фаза* – фаза синтеза вторичных метаболитов. Следовательно, при культивировании клеток можно регулировать процесс роста клеток в зависимости от поставленных задач [31–33].

Следует отметить, что рост мицелиальных микроорганизмов (например, грибы, стрептомицеты) сопровождается увеличением числа и размеров гиф мицелия, поэтому рост таких генотипов описывается более сложной кинетикой [123].

### 3.2. Питательная среда для культивирования клеток

Одной из важных предпосылок успешного применения метода культивирования клеток в различных сферах биотехнологии является разработка питательных сред. Среда, обеспечивающая рост и развитие клеток благодаря оптимальным физико-химическим условиям и наличию в своем составе компонентов, необходимых для нормальной жизнедеятельности, называется *питательной* (культуральной) [1, 41, 115].

В табл. 3.3 показана классификация питательных сред для культивирования клеток.

Таблица 3.3

Классификация питательных сред для культивирования клеток

| № п/п | Категория | Класс | Краткая характеристика |
|---|---|---|---|
| 1 | Физическое состояние | Жидкая | Основной компонент представлен водой. Применяют для культивирования, накопления биомассы или продуктов обмена |
| | | Полужидкая | Включает воду и агар (полисахарид, получаемый из морских водорослей; до 0,15–0,7 %). Применяют для культивирования анаэробных микроорганизмов |

продолжение табл. 3.3

| № п/п | Категория | Класс | Краткая характеристика |
|---|---|---|---|
| 1 | Физическое состояние | Твердая (плотная) | Основной компонент представлен агаром (3–5 %) или желатином (белок, получаемый из костей, хрящей и кожи животных). Применяют для выделения чистых культур, количественного учета и хранения микроорганизмов |
| 2 | Происхождение | Натуральные | Состоит из продуктов животного или растительного происхождения (отвары, экстракты, соки, молоко, кровь). Имеют сложный и богатый компонентный состав |
| | | Синтетические | Представляют собой комплекс определенных химически чистых соединений, взятых в точно указанных концентрациях |
| | | Полусинтетические | Содержат как натуральные, так и синтетические компоненты |
| 3 | Назначение | Общие | Применимы для клеток микро- или макроорганизмов |
| | | Специализированные | Для микроорганизмов: элективные (рост только одного вида), дифференциально-диагностические (видоспецифический рост); обогатительные (размножение и накопление). Для макроорганизмов: селективные (клеточная селекция); экстракорпорального оплодотворения, рекультивации, криоконсервации и т. д. |
| 4 | Химический состав | Простые | Среды, обогащенные минеральными солями (минеральные среды). |
| | | Сложные | Среды, дополнительно с солями содержат биополимеры (белковые среды) |

Как показано в табл. 3.3, питательные среды в подавляющем большинстве включают воду, органические вещества, не-

органические соли, низкомолекулярные синтетические соединения, сывороточные или серозные компоненты.

Все ингредиенты растворяют в 1 л дистиллированной воды, доводят до кипения, фильтруют через бумажный фильтр, разливают по флаконам, стерилизуют в автоклаве при 121 °С в течение 15–30 мин. По необходимости непосредственно перед употреблением добавляют дрожжевой экстракт, сыворотку, различные факторы роста, антибиотики и пр. [1, 20, 41, 115].

Следует отметить, что подбор качественного состава питательных сред строится на основе учета особенностей метаболизма биообъектов в культуре и их сбалансированного взаимодействия.

Независимо от состава, питательная среда для культуры клеток выполняет три жизнеобеспечивающих функций: создает для культуры благоприятные физико-химические условия, обеспечивает культуру энергией, обогащает культуру питательными веществами. Требования, предъявляемые питательной среде, показаны в табл. 3.4.

Таблица 3.4

Требования, предъявляемые питательной среде [1, 20, 41, 108, 109, 115]

| № п/п | Показатель | Требование | Условие |
|---|---|---|---|
| 1 | Источник энергии | Быть доступным для клетки | К таким источникам относят свет (для фототрофов), органические и неорганические субстраты. |
| 2 | Питательность | Быть достаточным по содержанию органических и неорганических веществ | Содержание всех необходимых компонентов для питания клетки, в том числе низкомолекулярных |

продолжение табл. 3.4

| № п/п | Показатель | Требование | Условие |
|---|---|---|---|
| 2.1 | Изотоничность | Должна содержать набор солей | Поддержание осмотического давления, ионного баланса, определенного pH и буферной емкости среды |
| 2.2 | Обогащение питательности и усиление защитных свойств добавками | Должна иметь возможность применения в специфических целях | сыворотка крови животных (предохранительный физиологический буфер) в концентрации 5–15 % является неоценимым источником питательных и защитных веществ |
| | | | дрожжевой экстракт в концентрации 0,1–0,5 % усиливает рост клеток и продлевает срок их жизни в культуре |
| | | | антигрибковые препараты: антибиотики гентамицин, пенициллин, стрептомицин и др. (50–100 мкг/мл) |
| 3 | Физико-химические условия | Должна обеспечивать все внешние условия, которые имелись при *in vivo* или *in situ*: | |
| | | Температура | Оптимальность при вариации от 5–10 °С (психрофилы) и 25–37 °С (мезофиллы) до 45–90 °С (термофилы); для клеток растений 25–26 °С (для тропических растений 30 °С), клеток животных 36–38 °С |
| | | pH | Большинство бактерий растет при pH, близком к 7,0–7,5 (сапрофитные бактерии при pH, равном 8,2–8,5), микроскопические грибы и дрожжи предпочитают слабокислые среды (pH = 4,0–6,0), клетки высших эукариот от 5,0–6,0 (клетки растений) до 7,2–7,4 (клетки животных) |

продолжение табл. 3.4

| № п/п | Показатель | Требование | Условие |
|---|---|---|---|
| 3 | Физико-химические условия | Свет | Культивируют в камерах, оснащенных флуоресцентными лампами дневного света (цианобактерии, микроводоросли) или лампами накаливания (пурпурные и зеленые бактерии, клетки растений). Остальным свет не требуется. |
| | | Осмотическое давление | В пределах 210–310 mOsm |
| | | Вода | Доступность воды в субстрате выражают величиной активности воды, которая находится в пределах от 0,61 до 0,99. Для приготовления сред используют воду с удельным сопротивлением 12–18 мОм. |
| | | Аэрация | Учитывают интенсивность (скорость растворения кислорода в единице объема культуральной жидкости за единицу времени) и степень (объем воздуха, продуваемый через объем жидкости) аэрации |
| 4 | Прозрачность | Обеспечение визуализации | Требуется для возможности отслеживать рост и развитие популяции клеток, для проведения оценки и отбора |
| 5 | Асептичность | Отсутствие контаминантов | Должна обеспечивать изоляцию от чужеродной микрофлоры |

В целом, как это видно из табл. 3.4, среда должна быть асептичной, стабильной, содержать растворимые компоненты, обладать ростостимулирующей активностью и ни в коем случае не должна быть токсичной.

Проверка питательных сред, растворов и сывороток на стерильность проводят путем контроля на отсутствие контаминантов (чужеродной микрофлоры) с помощью бактериологических сред (мясопептонный бульон с 5 % глюкозы, кровяной агар, среда Сабура, Чапека). Микробиологические высевы помещают на 14 сут. в термостат при 20–22 °С (микроскопические грибы) и 37 °С и ведут за ними повседневное наблюдение. Проверенные таким образом стерильные среды до употребления хранят в холодильнике при температуре –4 °С в пределах установленных сроков хранения [81, 82].

Следует отметить, что любой исследователь при работе с культурами всегда занимается разработкой оптимальных по составу сред. Поэтому количество рецептов питательных сред постоянно возрастает. Наиболее сложным по качественному составу являются среды, предназначенные для культивирования клеток и тканей высших эукариот, тогда как для микроорганизмов состав сред менее насыщен питательными ингредиентами, например, для цианобактерий используется среда без глюкозы, а для грибов – без витаминов и гормонов.

Состав питательной среды зависит не только от вида клетки, но и типа. Если при культивировании микроорганизмов и соматических клеток высших эукариот задача сводится к накоплению биомассы, то при работе с клетками репродукции (гаметы и эмбрионы) макроорганизмов – получению, в последующем, полноценного генотипа. В связи с этим питательная среда, предназначенная для культивирования гамет и эмбрионов, дополнительно обогащается активными белковыми добавками репродуктивного характера [41, 74, 129].

### 3.3. Типовые приемы и технология культивирования

Процесс культивирования начинается с того момента, когда заранее подготовленный посевной материал вводится в биореактор (ферментер). Посевная концентрация в 1 мл среды зависит от вида культуры, способа культивирования, конечной цели исследований и промышленного производства и может колебаться от 60–80 тыс. до $2–5x10^5$ клеток [52, 122, 123].

При культивировании клеток про- и эукариот применяют единую технологию и аппаратуру.

### *3.3.1. Биореакторы для осуществления биотехнологических процессов*

Биореакторы – это герметические цилиндрические емкости, объемом от 1,0 л (лабораторные: контейнеры, качалки, роллеры, спиннеры) до 500 $м^3$и более (промышленные: биореакторы, геобиореакторы), предназначенные для создания благоприятных условий для роста, размножения клеток и синтеза метаболитов.

На рис. 3.2 представлена принципиальная схема конструкции биореактора.




Рис. 3.2. Принципиальная схема конструкции биореактора

Конструктивные подходы для биореакторов различны, но, как видим из рис. 3.2, основные принципы их работы вне зависимости от их технической характеристики сводятся к выполнению трех ключевых положений:

1. Биореактор – это открытая система вследствие наличия двух типов отверстий:

– первый тип отверстий предназначен для поступления питательных веществ, кислорода, культуры,

– второй тип отверстий – для вывода определенных веществ: газов, слив среды, метаболитов и др.

2. Биореактор – это система, обеспечивающая перемешивание субстрата. Присутствие мешалок для перемешивания

предотвращает слипание клеток между собой и способствует равномерному распределению в объеме сосуда компонентов питательной среды, кислорода и биоматериала.

3. Биореактор – это контролируемая и управляемая система вследствие наличия блока управления с программным обеспечением контроля и поддержания оптимальных условий культивирования.

В табл. 3.5 дается краткая характеристика биореакторным установкам.

Из табл. 3.5 видно, что в практике современной индустриальной биотехнологии различают три типа биореакторов.

Биореакторы для культивирования могут быть классифицированы как «замкнутые» и «открытые». В первом случае многие компоненты системы не могут быть из нее удалены или добавлены, во втором – компоненты могут постоянно добавляться и удаляться из биореактора.

Биореакторы могут функционировать на основе разовой, восполняемой и непрерывной загрузки. А в самих реакторах культуры могут быть статическими и перемешивающимися, находиться в присутствии кислорода (аэробы) или без него (анаэробы), а также в водной или твердой фазе.

Массообмен в биореакторах независимо от режима культивирования обеспечивается тремя способами – аэрацией культуры газовой смесью, через газопроницаемые мембраны и диффузионного переноса $0_2$ и $CO_2$, через газо-жидкостные интерфазы. Последний наблюдается в биореакторах с пленочным матриксом и широко используется при роллерном методе культивировании.Процессы, протекающие в биореакторах, осуществляются при умеренных значениях pH (около нейтрального) и температуры (от 20 до 60 °С).

Интенсивная аэрация культуральной среды для протекания в биореакторах успешных ферментационных процессов сопровождается нежелательным пенообразованием, для предотвращения которого используют, в основном, механические сбиватели пены, реже – пеногасители химической природы (эруковая кислота, силиконы).

Таблица 3.5

**Биореакторы: классификация и краткая характеристика**

| Категория | Общая особенность конструкторского решения | Биореактор | Применение |
|---|---|---|---|
| По способу подвода энергии к газовой фазе | аэрация и перемешивание осуществляются сжатым воздухом, подающимся в реактор под определенным давлением | Барботажный | Производство поверхностно-активных веществ (ПАВ) и ферментов для химической промышленности |
| | | Эрлифтный | Производство белков одноклеточных организмов, глутаминовой кислоты |
| | | Газлифтный | Культивирование термофильных микроорганизмов |
| | | Форсуночный | Биоочистка воздуха, биоочистка воды |
| | | Колонный (чаще секционированный) | Культивирование дрожжей на н-парафинах. Иммобилизованная ферментация |
| По способу подвода энергии к жидкой фазе | Самовсасывающая мешалка | Турбинный самовсасывающийся | Для механически чувствительных клеток, например, для мицелиальных грибов. Аэробная очистка сточных вод |
| | | Турбоэжекторный | Микробиологический синтез |
| Комбинированный подвод энергии | Для аэрации – к газовой фазе, для перемешивания – к жидкой фазе | Комбинированный | Широкий спектр применения |

продолжение табл. 3.5

| Категория | Общая особенность конструкторского решения | Биореактор | Применение |
|---|---|---|---|
| По способу перемешивания | Аэрация путем барботажа | Биореакторы с механическим перемешиванием | Химическая и нефтехимическая промышленность. Производство противовирусных препаратов |
| | Перемешивание и аэрация обеспечиваются вращающимися дисками с отверстиями | Биореакторы с пневматическим перемешиванием | Производство биомассы микроорганизмов |
| | Насосы или эжекторы создают направленный ток жидкости | Биореакторы с циркуляционным перемешиванием | Микробиологический синтез |

Основные требования, предъявляемые биореакторам, – это герметичность, стерильность, контролируемость и управляемость. Благодаря этим качествам культивирование биомассы в биореакторах имеет следующие *преимущества*:

1) культивирование можно проводить без нарушения режима асептики;

2) можно контролировать рост и продуктивность биомассы путем воздействия различных биохимических и физико-химических факторов;

3) отбирать пробы клеток для определения динамики их роста и метаболизма;

4) гомогенность культуральной среды и культуры;

5) оптимальные массообменные характеристики по потреблению питательных веществ и отводу продуктов метаболизма;

6) простота наладки обслуживания и стандартность блоков оборудования для культивирования;

7) возможность осуществления масштабного перехода и автоматического контроля регулирования основных параметров культивирования;

8) теплообмен обеспечивается поддержанием оптимальной температуры;

9) пеногашение.

### *3.3.2. Режим культивирования клеток в биореакторах*

В биореакторах *по характеру подкормки* культивирование может осуществляться периодически, подкормочно и непрерывно. Эти режимы охарактеризованы в табл. 3.6.

Таблица 3.6

Режимы культивирования в сравнительном аспекте

| Показатель | Режим культивирования | | |
|---|---|---|---|
| | Периодическое | Подкормочное | Непрерывное |
| Определение | Клетки растут в постоянном объеме питательной среды с добавлением в нее только газов | В реактор порционно вводится свежая питательная среда | Выращивание клеток осуществляют в системе, обеспечивающей равные скорости подачи и удаления культуры |
| Особенность системы | Замкнутая | Открыта для ввода | Открыта для ввода и вывода |
| Состояние питательной среды | Состав среды и окружающие условия меняются | Скорость ввода среды определяется скоростью роста или биосинтеза | Поступление питательных компонентов регулируется для клеток плотностью популяции |

продолжение табл. 3.6

| Показатель | Режим культивирования | | |
|---|---|---|---|
| | Периодическое | Подкормочное | Непрерывное |
| Особенности поведения культур | Культуры проходят разные фазы развития. Размножение клеток поддерживается только в течение ограниченного времени | Когда реактор наполняется, его частично или полностью опорожняют. Применяется при получении биопрепаратов | Непрерывный процесс культивирования. Культура поддерживается в экспоненциальной фазе роста. Применяется при производстве БАВ (биологически активных веществ) в больших количествах |
| Конечная стадия | После замедления прироста биомассы суспензия разводится до начальной плотности и цикл культивирования повторяется | Процесс после опорожнения либо завершается, либо продолжается | Длительность культивирования обычно определяется производственной необходимостью и техническими возможностями |

Как следует из табл. 3.6, размножение клеток для периодического культивирования строго лимитировано, тогда как при подкормочном и непрерывном культивировании процесс роста клеток может регулироваться в зависимости от намеченных задач. Следовательно, на продуктивность клеток влияют массообменные характеристики системы культивирования (обеспечение клеточной культуры кислородом, углекислым газом; поддержание концентрации водородных ионов – pH) и необходимые окислительно-восстановительные условия.

Схема организации непрерывного перфузионного культивирования изображена на рис. 3.3.

Из рис. 3.3 видим, что принцип непрерывного культивирования клеток обеспечивается тремя составляющими:

– аппаратурным протоколом, включающим аппараты и машины вспомогательного (аппараты и машины, предназначенные для подготовки сырья, выделения и очистки биотехнологического продукта) и основного (наличие биореактора, где осуществляется культивирование клеток, и двух сосудов, один из которых предназначен для ввода, другой – для вывода среды) промышленного технологического цикла производства;

– протоколом режима работы аппаратов и машин в общей технологической схеме промышленного производства(на примере биореактора, который предполагает управление физико-химическими, такими как перемешивание, температура, pH, питательная и энергетическая ценность, аэрация и биологическими (фазово-целевой рост культуры) процессами культивирования);

– протоколом соблюдения комплекса асептических мероприятий, направленных на обеспечение отсутствия возможных посторонних контаминантов в процессе культивирования клеток – продуцентов.

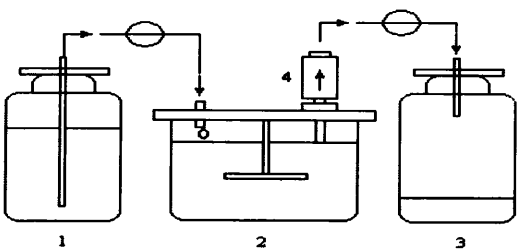



Рис. 3.3. Схема непрерывного перфузионного культивирования:
*1 – сосуд для питательной среды; 2 – биореактор;*
*3 – сосуд для продукции; 4 – насос*

### *3.3.3. Способы культивирования клеток*

Выделяют два основных способа культивирования клеток:

1. Твердофазное культивирование. Различают культивирование на поверхности твердой фазы (однослойная стационарная культура); методология применима в лабораторных условиях (широко практикуются чашки Петри и пробирки) и глубинное твердофазное культивирование в биогеореакторах (биореакторы

геологического масштаба, образуются, например, при захоронении твердых бытовых отходов на полигонах).

2. Культивирование в жидкой среде (глубинное культивирование; рис. 3.3), осуществляемое статическим (массопередача между клетками, питательной средой и газом осуществляется за счет диффузии) или динамическим путем. Во втором случае массопередача осуществляется тремя подходами: при культивировании в движении находятся либо (1) поверхность для культивирования клеток (матрица), либо (2) – питательная среда, либо (3) – все фазы культивирования (клетка – жидкость – газ). Данные системы культивирования применяются для всех типов клеток как при небольших (статический метод), так и больших (динамический метод) масштабах производства.

В зависимости от метода, благодаря которому культура поддерживается в состоянии динамического равновесия (когда удельная скорость роста равна скорости разбавлению культуры потоком среды), различают *турбидостатный* (скорость притока обеспечивает постоянную концентрацию биомассы в системе) и *хемостатный* (в системе ограничение роста обеспечивается лимитированием одного из субстрата, например, углерода, кислорода и др.) принципы.

### *3.3.4. Методы культивирования клеток*

В зависимости от состояния и расположения клеток в культуре различают четыре метода культивирования, представленные в табл. 3.7.

Как видно из табл. 3.7, в биореакторах биокатализаторы (клетки, ферменты) могут быть *свободными* или *иммобилизованными* (прикрепленными к поверхности биореактора или к специальным устройствам).

При взвешенном состоянии клеток в культуре применяют роллерный или суспензионный метод культивирования, а прикрепленное состояние клеток в культуре обеспечивается однослойным стационарным методом или методом культивирования на микроносителях.

Таблица 3.7

Методы культивирования клеток [1, 20, 22, 41, 123]

| Состояние клеток в культуре | Метод | Особенность и применение | Аппаратурное оформление | Посевная концентрация, кл/мл среды | Преимущество |
|---|---|---|---|---|---|
| Взвешенное | Роллерный | Периодическое обмывание средой клеточного монослоя. При накоплении биомассы | Стеллажно-ярусные аппараты для вращения (0,5–1 об/мин) флаконов (1–20 л) | 300–600 тыс. | Экономичны, оптимальность отношения полезной площади к объему среды |
| | Суспензионный | Длительное культивирование. При накоплении биомассы | Биореакторы с интенсивно перемешивающимися устройствами | от 0,3 до $10x10^5$ | Однородность суспензии, длительное поддержание логарифмической фазы роста, экономичность |
| Прикреплённые | Однослойный стационарный | Прикрепляются к стеклу сосудов. При получении первичных, а также вирусных метаболитов | Биореакторы для клеток высших эукариот | 400–750 тыс. | Решает проблемы, связанные с канцерогенезом, регенерацией, аллергической реакцией и трансплантологией |

продолжение табл. 3.7

| Состояние клеток в культуре | Метод | Особенность и применение | Аппаратурное оформление | Посевная концентрация, кл/мл среды | Преимущество |
|---|---|---|---|---|---|
| Прикрепленное | На микроносителях | Сочетает элементы монослойного и суспензионного выращивания клеток. Широкий спектр применения | Биореакторы для суспензионного культивирования | На одной частице микроносителя диаметром 160–230 мм может поместиться 350–630 клеток | Повышают производительность: высокой плотности клеточной популяции до 5–6 млн. клеток в 1 мл |

Особенностями для рассматриваемых методов являются: роллерный и суспензионный метод культивирования предпочтителен при размножении клеточной массы, однослойный стационарный метод культивирования – для производства первичных метаболитов, в том числе вирусных, метод культивирования на микроносителях имеет широкий спектр применения – от производства первичных и вторичных метаболитов до наращивания биомассы.

### *3.3.5. Культивирование клеток в зависимости от процесса масштабирования*

Масштабы культивирования клеток могут быть лабораторными, полупромышленными и промышленными, цель и задачи которых представлены в табл. 3.8.

Таблица 3.8

Культивирование клеток в зависимости от процесса масштабирования

| Показатель | Культивирование клеток в зависимости от процесса масштабирования | | |
|---|---|---|---|
| | лабораторное | полупромышленное | промышленное |
| Решаемые задачи | Изучение культуральных свойств, определение режима культивирования и кинетики роста, биотестирование | Поиск целесообразных или разработка новых технологий с отработкой всех аспектов производства | Отработка (налаживание) производства и его оптимизация. Масштабирование и коммерческая реализация биотехнологических производств и продуктов |
| Приоритетные процедуры | Выделение, выращивание, пассажирование или длительное хранение (криозамораживание) | Проведение пилотных испытаний | Производство биомассы, первичных и вторичных метаболитов. Ферментационные процессы (биоочистка, биодеградация, биотрансформация и др.) |
| Аппаратурное оформление процесса | На уровне чашек Петри, пробирок и колб в термостатах, на магнитных подогреваемых мешалках или в малых биореакторах (1–10 л → 30 л) | Биореактор (до 300–500 м$^3$) | Биореактор (от 500 м$^3$ и более), каскад биореакторов, геобиореактор |

Как видно из табл. 3.8, лабораторное культивирование предполагает выполнение следующих ключевых процедур: выделение, выращивание и хранение клеток.

Клетки высших эукариот выделяют из тканей и органов растений или животных, клетки микроорганизмов – из объектов экосистем (атмосфера, литосфера, гидросфера, техногенные объекты окружающей среды). Клетки, взятые непосредственно от объекта, называются *первичными*. Большинство первичных клеток, за исключением опухолевых, имеют ограниченный срок использования. Клетки выращивают в специальных питательных средах, при постоянной температуре и в специальной газовой среде в инкубаторе клеточных культур. Во избежание загрязнения культур соблюдают все правила асептики в стерильном боксе, дополнительно в питательную среду могут быть добавлены антибиотики и противогрибковые препараты.

В табл. 3.9 в сравнительном аспекте кратко изложена информация об особенностях лабораторного культивирования клеток животных, растений и бактерий.

Таблица 3.9

Культивирование клеток животных, растенийи микроорганизмов в сравнительном аспекте [1, 20, 34, 37, 41, 123]

| Показатель | Клетки | | |
|---|---|---|---|
| | бактерий | растений | животных |
| Требования к питательной среде | Более широкая степень разнообразия к составу и к окружающим условиям | Средний уровень требований к условиям выращивания | Сложный состав и строгие требования к условиям для выращивания и хранения |
| Особенность | Аэробное, анаэробное. Способ питания: автотрофы (хемоавтотрофы, фотоавтотрофы), гетеротрофы | Свет определенного типа и интенсивности, соблюдение длительности циклов пребывания *«свет – темнота»* | Растут в темноте, период жизни первичных культур 50±10 пассажей |

продолжение табл.3.9

| Показатель | Клетки | | |
|---|---|---|---|
| | бактерий | растений | животных |
| Лабораторное выращивание клеток | Термостат | Бокс для выращивания, комната с контролируемыми внешними условиями | Стандартные углекислотные инкубаторы |
| Среда для культуры | Сложные и простые | Сбалансированная смесь макро (N, P, K, Ca, Mg, S), микроэлементов (Mn, Fe, Zn, Cu, Mo, Cl), витамины (B), источники углерода (глюкоза, сахароза), регуляторы роста (ауксины, цитокины) | Сложная смесь питательных веществ, солей и антибиотиков, сыворотка крови |
| Характеристика клеток в культуре | Агаризованная твердая среда используется для учета обсемененности, идентификации, разделения смешанных культур, выделения чистых культур. После выделения культуры (чистая культура) размножаются на жидких питательных средах | Экспланты (срез из любой части растения). Каллус (недифференцированные клетки с небольшим количеством цитоплазмы и с большими вакуолями) образуется вскоре после вырезания. Суспензия клеток (режим культивирования: периодический, подпитываемый и непрерывный). Протопласт (сферическая, осмотически чувствительная клетка с целой клеточной мембраной, но без клеточной стенки) | Два типа: первичные культуры (непосредственно полученные из тканей, имеют ограниченный срок жизни и роста) и клеточные линии (клетки одного вида, имеют из-за трансформации неограниченный рост, т.е. *«бессмертны»*). Клеточные линии имеют более короткое время удвоения, при росте могут не прикрепляться и не прилипать к поверхности сосуда |

продолжение табл.3.9

| Показатель | Клетки | | |
|---|---|---|---|
| | бактерий | растений | животных |
| Применение | Утилизация отходов, биоконверсия отходов, производство БАВ, биовыщелачивание металлов | Генетическая трансформация, соматическая гибридизация; производство БАВ | Производство противовирусных вакцин, антител, БАВ |
| Требования техники безопасности к культуре | Высокие: меры безопасности: защитная одежда, вытяжной шкаф класса II и III, т.е.для среднего и высокого уровня риска соответственно: стерилизация, дезинфицирование, автоклавирование отходов культуры до уничтожения | Упрощены; меры безопасности: вытяжной шкаф класса I, т.е. для невысокого уровня риска, стерилизация образца раствором гипохлорита (1–10 %) | Высокие: определение инфекционного состояния донора, для устранения и уменьшения риска предпринять все меры безопасности: защитная одежда, вытяжной шкаф класса II и III |

Как видно в табл. 3.9, изложена информация по технике безопасности, даны требования, предъявляемые питательным средам и культурам в процессе культивирования клеток бактерий, растений и животных.

**Хранение клеточных культур**

Кратковременное хранение клеток возможно при пассажировании, длительное хранение – при криоконсервации.

*Пассажирование клеток* (субкультивирование) – процесс поддержания жизнеспособности клеток при пересеве на новую свежую питательную среду. Клетки пересевают до достижения ими конфлюэнтного состояния (слитыми в единую массу). После субкультивирования культура называется уже субкультурой (пассированной культурой).

Культуру клеток можно использовать значительно дольше, если регулярно осуществлять отбор клеточного материала, что

позволяет предотвратить преждевременное старение культуры вследствие повышения плотности заселения клеток.

Для более длительного сохранения клеточных культур используют метод *криоконсервации биообъекта*, направленный на создание банка генов и генотипов (метод криозамораживания). Вопросы, связанные с полупромышленным и промышленным культивированием, целесообразно рассмотреть в главах, посвященным прикладным аспектам биотехнологии.

Следует отметить, что переход от лабораторного к полупромышленному, а затем к промышленному культивированию сопровождается изменениями с одной стороны объема установки, с другой – конструкционных решений, с третьей – режима работы установки. Центральным решением при этом является подбор надежных критериев масштабирования, обеспечивающих разработку коммерчески высокоэффективных и экономичных технологий производства целевого продукта.

Контрольные вопросы

1. Что собой представляет питательная среда, и какие требования следует учитывать при их подготовке и применении?
2. Охарактеризуйте основные способы и подходы культур клеток.
3. Основные категории деления технологии культивирования.
4. Какие правила и условия следует соблюдать при культивировании?
5. Какие принципы необходимо учитывать при подборе биореакторов?
6. Опишите технологический принцип работы биореакторов в зависимости от конструкционных особенностей.
7. Какие задачи решаются в процессе масштабирования культуральных технологий?
8. Что понимают под «хранением клеточных культур»?

# 4. ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Промышленная биотехнология имеет своей целью создание и практическое внедрение эффективных технологий получения биологически активных веществ (БАВ), продуктов отраслей промышленности.Эти комплексные задачи требуют интеграции различных отраслей знаний и характеризуют биотехнологию как ряд перспективных технологий, направленных на индустриализацию биологических процессов.

## 4.1. Биотехнологическое промышленное производство

Биотехнологический процесс, направленный на производство биомассы и метаболитов слагается из элементов, представленных на рис. 4.1.

Из представленной на рис. 4.1 схемы видно, что компонентами биотехнологического процесса являются биообъект (биологический объект), субстрат и биореактор.

Биообъект (биологический агент) – это основной элемент биотехнологического процесса, обеспечивающий производство возобновляемой биомассы и метаболитов.

Номенклатура биологических агентов ежегодно расширяется. *«Львиная»* доля биотехнологической индустрии основана на использовании микроорганизмов.

Требования, предъявляемые к биообъектам в процессе биотехнологического производства, сводятся к таким характеристикам, как *безвредность* (должны характеризоваться безвредностью для окружающей среды, не иметь при крупномасштабном выращивании побочных токсичных продуктов обмена и отходов), *продуктивность* (должны при крупномасштабном производстве обеспечить высокий выход продукта в виде биомассы или производства метаболитов) и *резистентность* (должны сохранять свои основные физиолого-биохимические свойства, быть устойчивыми к различным факторам воздействия биогенной и антропогенной природы).

При масштабировании процесса следует учитывать эти требования, которые и составляют *принцип технологичности штамма.*

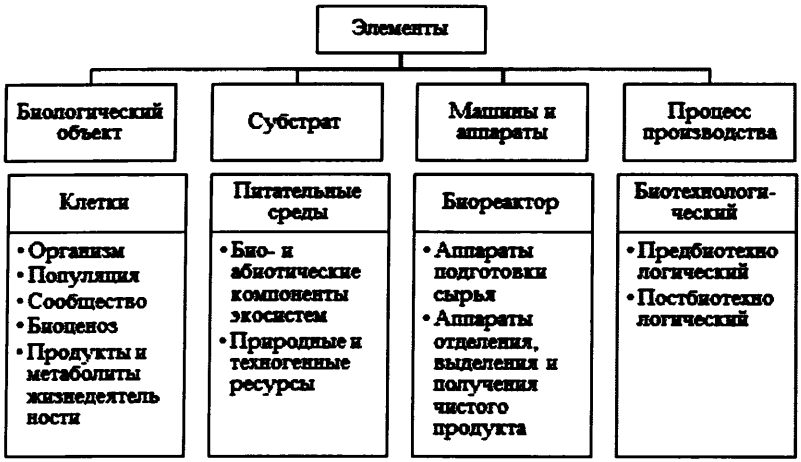



Рис. 4.1. Элементы производственного биотехнологического процесса

*Штаммы* (культура микроорганизмов, выделенная из определенного источника), применяемые в биотехнологии: *эталонный* (паспортизированная генетически однородная чистая культура), *производственный* (культура, предназначенная для производства биопрепаратов) и *контрольный* (культура, предназначенная для оценки качества вакцинных препаратов).

Штаммы законсервированных микроорганизмов (чистые культуры) поступают в ампулах с паспортом, где дается описание питательных сред, биологических и культуральных характеристик, условий для выращивания и хранения.

*Чистые культуры* – это однородные популяции микроорганизмов одного определенного вида или штамма. Чистую культуру получают из одной изолированной клетки, которую затем постепенно размножают в стерильной среде. Чистую культуру удобно изолировать, используя твердые среды Коха – агар, желатин и др.

Культуры хранят:

– на косом агаре при температуре минус 1–5 °С;

– замороженными при температуре ниже минус 20 °С;

– лиофилизированными в ампулах, хранящимися в течение нескольких лет;

– криоконсервированными при температуре минус 196 °С (длительно).

Время пересева при первом и втором подходе хранения культур видоспецифично.

Перед началом биотехнологического процесса культуру размножают в течение 24 ч в стерильных условиях (до 5–10 мл).

Субстраты, используемые для биотехнологии, разнообразны и их номенклатура постоянно расширяется. В процессе развития промышленных производств происходит накопление новых видов отходов, которые могут быть обезврежены и превращены в полезные для биотехнологии субстраты. На сегодня отмечен рост интереса к природным возобновляемым ресурсам – биоресурсам мирового океана и продуктам фотосинтеза.

Субстратами для культивирования микроорганизмов могут служить [89]:

1) природный газ;

2) древесина, солома;

3) парафины нефти;

4) меласса (отход сахарной промышленности темно-коричневого цвета; основной состав: 40–55 % сахарозы, 1,1–1,5% азота, витамины группы В до 70–80 мг/т, аминокислоты);

5) сок растений;

6) патока (побочный продукт при производстве сахара и крахмала);

7) крахмал;

8) сульфитный щелок (отход производства целлюлозы);

9) барда (продукт переработки спирта);

10) твердые бытовые отходы (ТБО) и др.

С использованием первого субстрата разработаны технологии получения белка (выход биомассы бактерии *Methylomonas*, усваивающие метан, *Hypomicrobium* и *Pseudomonas*, усваивающие метанол достигает 70 % от массы субстрата), второго – метилового спирта, который, в свою очередь, также может являться субстратом для производства белка высокого качества (на метаноле производят биомассу около 25 видов дрожжей, в том числе *Pichia polymorpha, Pichia anomala, Yarrowia lipolytica*), третьего – кормового белка из микробной биомассы на основе дрожжей рода *Candida* (выход биомассы может достигать до

100% от массы субстрата), от четвертого до девятого – белка пищевого и технического, десятого – биогаза и др. продуктов.

Типовая схема биотехнологического промышленного производства продуктов представлены на рис. 4.2 и табл. 4.1.

Как видно из рис. 4.2, биотехнологические крупномасштабные промышленные линии складываются из трех блоков:

1. Предбиотехнологический блок.

Предбиотехнологический блок представляет собой комплекс аппаратов и машин, предназначенных для подготовки сырья природного и техногенного происхождения, а также лабораторий, предназначенных для работы с культурами (подготовка посевного материала, предферментация), сырьем, газами и др.

2. Биотехнологический блок.

Биотехнологический блок оснащен биореакторами (каскадом биореакторов, биогеореакторами) для производства биотехнологической продукции.

3. Постбиотехнологический блок.

Постбиотехнологический блок включает комплекс аппаратов для выделения, очистки и концентрирования продукта и придания продукту готовой формы – это моечные и стерилизационные аппараты, аппараты для наполнения и запайки ампул, ёмкостей, порошкообразных препаратов, аппараты для наполнения и укупорки флаконов колпачком или насадкой, аппараты для нанесения кода (маркировка), аппараты для контроля на герметичность, этикетировочные аппараты, аппараты для капсулирования порошков и аппараты для сборки, наполнения и запайки тюбиков.

Как видно из табл. 4.2, для биотехнологического производства характерны следующие особенности:

1. Биотехнологический процесс реализовывается поэтапно.

2. Для получения готовой продукции в постбиотехнологический период применяются различные физико-химические методы выделения.

3. Биотехнологический процесс сопровождается производством широкого спектра продуктов, отличающихся органолептическими, физическими и химическими свойствами, а также по их месту в типовой технологической схеме.




Рис. 4.2. Схема биотехнологического производства (показаны только некоторые технологии) продуктов и концентрация целевого продукта отстадии производства до готовой формы продукта: **Выход продукта, %: 0,1–1– на выходе из биотехнологической стадии (методом генетической инженерии повышается до 50 %); 0,1– 2 – после стадии отделения биомассы; 1–10 – после стадии выделения; 50–80– после очистки; 90–100– после концентрирования* [17]

Таблица 4.1

Этапы биотехнологического цикла [17, 42, 44, 48, 56, 88]

| Период | Цель | Методы, подход или мероприятие | Краткая характеристика / или выполняемая задача | Особенность |
|---|---|---|---|---|
| **Предбиотехнологический** – этап организации процесса | Проведение подготовительных мероприятий для запуска процессов | Подготовка питательной среды | Подпор компонентов и приготовление среды, стерилизация с последующей загрузкой в биореактор. | Строгое соблюдение правил асептики |
| | | Подготовка сырья | Измельчение, дробление, помол, нагрев, химическая обработка | Цель – обеспечить максимальный доступ сырья к ферментативному воздействию |
| | | Подготовка продуцента | Культивирование для предварительного выращивания продуцента (промышленный штамм, инокулят, посевной материал) или подготовка биокатализатора | Строгое соблюдение правил асептики |
| | | Подготовка газов | Очистка, стерилизация и подогрев | Обычно используется воздух |
| | | Подготовка биореактора | Загрузка биореактора предварительно подготовленными субстратом, питательной среды и посевного материала, запуск газов | Перед запуском и эксплуатацией проверка исправности технико-эксплуатационных характеристик работы биореактора |

продолжение табл. 4.1

| Период | Цель | Методы, подход или мероприятие | Краткая характеристика / или выполняемая задача | Особенность |
|---|---|---|---|---|
| **Биотехнологический** – этап производства целевого продукта | Осуществление биопроизводственных и биореконструкционных процессов | Биоаугментация | Производство биомассы, биопрост | Увеличение биомассы |
| | | Ферментация | Процесс преобразования исходных реагентов (субстрата: углеродного, азотного, фосфорного) в продукты (клетки, метаболиты). Полученный в процессе ферментации целевой продукт локализован либо в самой биомассе, либо в субстрате | В аэробных процессах в состав субстрата входит $0_2$, а в состав продуктов – $CO_2$ |
| | | Биокатализ | Процессы химических реакций, реализующиеся с участием ферментных систем | Механизмы: окисление и восстановление, перенос химических функциональных групп от одних молекул на другие, синтез сложных соединений, гидролиз сложного субстрата, реакции с участием двойных связей, изомеризация |
| | | Биотрансформация | Процесс ферментативного изменения молекулярной структуры вещества | Механизмы: гидроксилирование, окисление спиртов до кетонов, дегидрирование, изомеризация, ароматизация, введение двойной связи, обрыв боковых цепей |

продолжение табл. 4.1

| Методы, подход или мероприятие | Краткая характеристика /или выполняемая задача | Особенность |
|---|---|---|
| Биотехнологический период | | |
| Биоокисление | Микробиологическое аэробное потребление загрязняющих веществ | Широко практикуется в биогеотехнологиях: бактериальное окисление концентрата (продукт обогащения руды), арсенопирита и пирита, серы и др. |
| Биоосаждение | Образование твердого осадка в растворе в ходе биохимической реакции | Практикуется в биогеотехнологиях и при очистке сточных вод |
| Биосорбция | Микробиологическая сорбция вредных примесей из газов или жидкостей на иммобилизованных носителях | Механизмы: ионный обмен, комплексообразование, образование нерастворимых соединений с ковалентными связями, окислительно-восстановительные процессы |
| Биовыщелачивание | Ферментативный процесс перевода нерастворимых в воде соединений металлов в растворенное состояние | Условия биовыщелачивания определяются типом руды, степенью ее окисления и проницаемостью, характером складирования, габаритами отвалов, способом подготовки руды или рудного тела к выщелачиванию на месте залегания и т. д. |
| Биоаккумуляция | Накопление техногенных загрязнителей (в том числе и радиоактивных изотопов) в организмах возрастающих трофических уровней | Практикуется в биогеотехнологиях и при защите окружающей среды |

продолжение табл. 4.1

| Методы, подход или мероприятие | Краткая характеристика /или выполняемая задача | Особенность |
|---|---|---|
| Биотехнологический период | | |
| Биодесульфуризация | Микробиологическое удаление серы из природного сырья | Осуществляют удаление примесей органической и неорганической серы из каменного угля и нефти |
| Биоремедиация | Комплексная технология очистки антропогенно загрязненных объектов окружающей среды | Широкий спектр использования метаболического потенциала биологических объектов – микроорганизмы, растения, насекомые, черви и другие организмы |
| Биоочистка | Биологическая очистка объектов окружающей среды | Практикуется при защите окружающей среды |
| Биовосстановление | Восстановление объектов окружающей среды биологическими методами | Практикуется при защите окружающей среды |
| Биодеградация | Разрушение сложных соединений и материалов микроорганизмами | Биологическая переработка отходов в аэробных (компостирование) и анаэробных (метановое брожение) условиях, а также биодеградация нефти, ксенобиотиков, пестицидов и др. |
| Биокомпостирование | Аэробная переработка органических веществ в твердых отходах биологическими агентами | Микробиологическая переработка отходов в аэробных условиях. Стадии процесса: мезофильная, термофильная, остывание, созревание |

продолжение табл. 4.1

| Период | Цель | Методы, подход или мероприятие | Краткая характеристика / или выполняемая задача | Особенность |
|---|---|---|---|---|
| **Постбиотехнологический**- этап получения и реализации целевого продукта | Разделение жидкости и биомассы | Фильтрация (микро, ультра) | Процесс отделения биомассы от раствора в процессе пропускания суспензии через фильтрующий материал | Практикуют для очистки стоков, для продуцентов мицелиальной природы при производстве антибиотиков |
| | | Центрифугирование (нано, ультра) | Разделение под действием центробежных сил | Также применяют для выделения вирусов (нано-), клеточных органелл, высокомолекулярных соединений (ультра-) |
| | | Сепарация | Разделение под действием центробежных сил | Механизмы: сепарация по массе, размеру, упругости, трению: сепарация воздушная, электрическая, магнитная, пенная, радиометрическая |
| | | Отстаивание | Процесс выделения из воды взвешенных веществ под действием гравитационных сил | Практикуется при очистке стоков |
| | | Коагуляция | Объединение мелких диспергированных частиц в более крупные с последующим отстаиванием | Признаки– увеличение мутности, появление хлопьевидных флокул, расслоение системы |
| | | Флотация | Метод, основанный на прилипании взвешенных в среде культур к пузырькам пены и выделение ее из пенной фракции | Практикуется при очистки сточных вод, а именно при выделении капель масел и нефтепродуктов |

продолжение табл. 4.1

| Цель | Методы, подход или мероприятие | Краткая характеристика / или выполняемая задача | Особенность |
|---|---|---|---|
| Постбиотехнологический период | | | |
| Выделение целевого продукта | Внутриклеточного (эндометаболита) | Дезинтеграция биомассы | осуществляется физико-механическими (обработка ультразвуком, замораживание-оттаивание, вращение лопасти или вибратора, встряхивания, осмотический шок, декомпрессия), химическими (воздействие толуолом, бутанолом) и ферментативными (например, лизоцимом) методами |
| | Внеклеточного (экзометаболита) | Методы перевода растворенного в жидкости продукта в твердую фазу (осаждение – с использованием реагента, адсорбция – на сорбентах, ионный обмен); (ультра) центрифугирование, (ультра, нано) фильтрация – для выделения вирусов, органелл, высокомолекулярных соединений – белков, полипептидов, полинуклеотидов); ректификация, отгонка – для выделения легкокипящих продуктов (этиловый спирт) | Выделение целевых продуктов из культуральной жидкости или экстрактов зависит от их химической и физической природы: проще выделить спирты, карбонильные соединения, кислоты, большинство антибиотиков, витамины, алкалоиды, сложнее – белковые препараты (ферменты, вакцины, антитела, гормоны) |

продолжение табл. 4.1

| Цель | Методы, подход или мероприятие | Краткая характеристика /или выполняемая задача | Особенность |
|---|---|---|---|
| Постбиотехнологический период | | | |
| Очистка целевого продукта | Задача – убрать примеси | Методы: экстракция, адсорбция, ионный обмен, ультрафильтрация и обратный осмос, ректификация, ферментолиз, диализ, хроматография, кристаллизация | |
| | Хроматография | Поочередное сорбирование на твердом носителе | Практикуется для белков, аминокислот, нуклеотидов и др. |
| | Диализ | Прохождение низкомолекулярных веществ через полупроницаемую перегородку, а высокомолекулярные остаются | Практикуется для очистки вакцин и ферментов от солей и низкомолекулярных растворимых примесей |
| | Кристаллизация | Формирование кристаллов из растворов целевых продуктов в процессе медленного охлаждения | Практикуется при получении, например, кристаллов пенициллина |
| Концентрирование продукта | Задача – обеспечить «отжим» растворителя из раствора | Методы: выпаривание, сушка, осаждение, кристаллизация с фильтрацией получившихся кристаллов, (ультра, нано-) фильтрация | Сопровождается очисткой от балластных низкомолекулярных примесей и увеличением активности фермента. |
| Изготовление готовой формы продукта | Задача – преобразовать продукт в товарную форму | Методы: гранулирование (создание гранул), драже-рование, таблетирование (создание драже, таблеток), розлив, ампулирование, фасовка | Продукт приобретает товарную форму |

продолжение табл. 4.1

| Период | Цель | Методы, подход или мероприятие | Краткая характеристика / или выполняемая задача | Особенность |
|---|---|---|---|---|
| **Биотехнологический** – этап утилизации отходов производства | Очистка стоков и выбросов | Биоутилизация отходов | Биотехнология очистки стоков и выбросов | Стадии: подготовительная, биотехнологическая, отстаивания биомассы активного ила, дополнительной очистки стоков и переработки осадка. Очищенная вода может быть возвращена в основное производство |

После биотехнологической стадии, как это указано в табл. 4.2 следует процесс очистки. Необходимо отметить, что степень очистки продуктов зависит от цели его применения: от грубой степени очистки (для технических ферментов) до ультрачистых продуктов (для фармацевтических препаратов, препаратов клинического анализа). Стоимость очистки продукта может достигать 50–70 % всех затрат на его производство [186].

Принципы разделения производимых продуктов определяются [123]:

1) размерами: фильтрация ($10^{1}$–$10^{3}$мкм), микрофильтрация ($10^{-1}$–$10^{1}$мкм), ультрафильтрация ($10^{-3}$–$10^{1}$мкм);

2) плотностью: седиментация (10–$10^{3}$мкм), сепарирование (10–$10^{3}$ мкм), центрифугирование ($10^{-1}$–$10^{3}$ мкм), ультрацентрифугирование ($10^{-3}$–10 мкм);

3) поверхностными свойствами: флотация ($10^{-1}$–$10^{3}$ мкм);

4) растворимостью: экстракция, осаждение, кристаллизация ($10^{-3}$–10 мкм);

5) давлением пара: дистилляция ($10^{-3}$–10 мкм);

6) зарядом: ионообменная хроматография, электродиализ ($10^{-4}$–$10^{-1}$ мкм);

7) диффузией: осмос ($10^{-4}$–$10^{-2}$ мкм), диализ ($10^{-4}$–10 мкм);

Для получения общего представления приводится упрощенная классификация продуктов биотехнологического производства:

1) газообразные продукты ферментации:

– диоксид углерода, образуется при спиртовом производстве,

– биогаз, производится в процессе анаэробной деструкции органических отходов,

– водород, выделяется при культивировании фототрофов;

2) среда ферментации:

– культуральная жидкость вместе с микроорганизмами (например, закваска, производимая в пищевой промышленности),

– культуральная жидкость с экстрагированными из твердой фазы компонентами (биовыщелачивание металлов из руд, микробиологическое обессеривание угля и нефти),

– жидкость, полученная после отделения биомассы (фильтрат),

– концентрат культуральной жидкости (например, кормовой лизин, кормовые антибиотики),

– концентрат жидкости, получаемый с помощью выпаривания, сушки или ультрафильтрации,

– очищенный от загрязнений субстрат (поток жидкости, при очистке сточных вод; твердая среда, например, почва при микробиологической очистке; компост при переработке органических отходов);

3) биомасса:

– инактивированная биомасса микроорганизмов (например, кормовые дрожжи);

– ослабленная биомасса микроорганизмов (например, живые вакцины лишенные патогенности);

– жизнеспособная биомасса микроорганизмов (биопрепарат: жидкий, высушенный; например, бактериальные средства защиты растений, бактериальные удобрения, биодеструкторы нефтяных загрязнений, силосные закваски, пекарские дрожжи и др.),

– переработанная биомасса микроорганизмов (клеточные оболочки, получаемые после разрушения микроорганизмов и применяемые как сорбент для очистки пищевых жидкостей, гидролизаты и ферментолизаты, используемые как вкусовые добавки);

4) биопродукт:

– внеклеточный (этанол, выделяемый из среды отгонкой; многие медицинские антибиотики, чистые пищевые или медицинские аминокислоты, лимонная кислота и др),

– внутриклеточный (различной степени очистки: многие антибиотики, витамины, нуклеотиды).

**Ферментация.** Процессы ферментации классифицируются по признаку целевого продукта, по фазе протекания процесса, по отношению к кислороду и температуре, по способу организации, числу видов микроорганизмов, по отношению к свету и степени защищенности от посторонней микрофлоры (табл. 4.2).

Таблица 4.2

Классификация ферментационных процессов

| Характеризуемый признак | Классификация | Разъяснение/ пример |
|---|---|---|
| Производство целевого продукта | Выращивание биомассы | Производство белка одноклеточных организмов (БОО) |
| | Биосинтез продуктов метаболизма | Ферментация, Биокатализ |
| | Биоутилизация исходной среды | Биоокисление, биокомпостирование и биодеградация |
| Физическое состояние фазы протекания процесса | Твердофазная | Биокомпостирование, производство сыра, колбасных изделий |
| | Жидкофазная | Биомасса микроорганизмов суспендирована в питательной жидкой среде |
| | Газофазная | При очистке газов от вредных примесей: микроорганизмы иммобилизуются на твердом носителе. взвешенных в потоке газа |

продолжение табл.4.2

| Характеризуемый признак | Классификация | Разъяснение / пример |
|---|---|---|
| Способ организации | Периодические | Единовременная загрузка сырья и посевного материала в аппарат, по окончании процесса среда выгружается из аппарата |
| | Непрерывные | Загрузка и выгрузка среды протекают непрерывно и одновременно |
| | Отъемно-доливные | После некоторого времени процесса, часть ферментационной среды выгружают и заменяют свежей средой |
| | Многоциклические | Каждый последующий процесс начинается в биореакторе с остаточной части ферментационной жидкости (посевного материала) |
| | Полунепрерывные с подпиткой субстрата | Сочетание отъемно-доливных и подпиточных |
| | Периодические с подпиткой субстрата | Часть среды загружается в начале ферментации, другая – по мере протекания процесса |
| Степень изоляции от посторонней микрофлоры | Асептическая | Производство БАВ |
| | Условно асептическая | Производство кормовых БОО (белок одноклеточных организмов) |
| | Неасептическая | Биокомпостирование, биовыщелачивание, биоремедиация |
| Численность биологических культур | Монокультурная | Культивирование одного вида микроорганизмов |
| | Поликультурная | Культивирование сообществ микроорганизмов |

продолжение табл.4.2

| Характеризуемый признак | Классификация | Разъяснение/ пример |
|---|---|---|
| Отношение к молекулярному кислороду | Аэробная | В присутствии молекулярного кислорода |
| | Факультативно-анаэробная | Организмы, энергетические циклы которых проходят по анаэробному и аэробному пути |
| | Анаэробная | Микроорганизмы, получающие энергию путем субстратного фосфорилирования |
| Отношение к свету | Фототрофная | Световая |
| | Хемотрофная | Темновая |

Из табл. 4.2 мы видим высокую вариацию в подходе к ферментации, с одной стороны от строгих соблюдений правил асептики (при производстве метаболитов) до полного его игнорирования (при твердофазной ферментации, биодеградации), способа организации (от периодического до непрерывного), с другой – от физического состояния среды (от жидких в биореакторах до твердых в геобиореакторах) до видовой численности продуцентов (моно-, поликультурная).

Из вышеизложенного, можно выделить основные принципы культивирования микроорганизмов:

1. Культивирование аэробных микроорганизмов осуществляют двумя подходами: поверхностное, когда микроорганизмы культивируют на поверхности жидких или плотных сред и глубинное – внутри жидкой питательной среды. В первом случае кислород поступает в клетки микроорганизмов непосредственно из воздуха, во втором – при аэрации (микроорганизмы используют растворенный кислород).

2. Культивирование анаэробных микроорганизмов осуществляют в анаэростате в толще питательной среды, в высоком слое среды или вязкой среде (с присутствием в среде картофельной муки и агара в концентрации 0,2–0,3 %). Основной принцип – исключение молекулярного кислорода, создание и

поддержание в них низкого окислительно-восстановительного потенциала.

В дальнейшем проводят определение всех морфологических и физиологических свойств изолированных культур и определяют их систематическое положение. Для каждой чистой культуры составляют паспорт, где подробно дается ее описание. Далее паспортизированный штамм успешно применяется в различных отраслях промышленности.

### 4.2. Производство биомассы для получения промышленной продукции

Жесткая конкуренция на добычу истощаемого невозобновляемого сырья и их возрастающая потребность для функционирования промышленных производств предопределило перспективу для получения возобновляемой биомассы.

**Производство биомассы микроорганизмов** – это многогранная, многофункциональная и «гибкая» биохимическая система производства элементов и соединений химической и биологической природы. Полученную биомассу, как эффективный и производительный катализатор химических превращений, успешно применяют во всех отраслях производства.

Методами микробиологической биотехнологии производят микробную биомассу, продукты первой (первичные продукты метаболизма) и второй (вторичные продукты метаболизма) фазы [45, 49, 55, 62, 65, 86, 87, 101, 111].

Первичные продукты метаболизма (необходимые для жизнедеятельности метаболиты – это нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы) накапливаются в культуре в логарифмической фазе. Вторичные продукты метаболизма (идиолиты), накапливающиеся в культуре в стационарной фазе роста, представляют собой низкомолекулярные соединения (антибиотики, алкалоиды, пигменты, токсины).

При оптимальных условиях в среде культивирования можно достичь выхода до 100г/л сухой биомассы.

Вес произведенной биомассы микроорганизмов определяют после отделения клеток от культуральной среды путем цен-

трифугирования и составляет в зависимости от производимой культуры 30–95 %.

Упрощенный элементный состав биомассы микроорганизмов: сухая масса клеток достигает 95–96 %, из них 50 % приходится на углерод, 20 % на кислород, 14 % – на азот, 8 % – на водород, 3 % – фосфор, по 1 % - на серу и калий, по 0,5 % – на кальций и магний и 0,2 % – на железо.

Сухое вещество бактерий представлено, в основном, полимерами: белки составляют 50 %, РНК – 10–20 %, ДНК – достигает 3 %, компоненты клеточной стенки – 10–20 %, а также липиды – до 10 %.

Белок одноклеточных организмов (БОО) – биомасса микробного происхождения. Под производством БОО понимают крупномасштабное выращивание промышленно значимых микроорганизмов. Производство БОО имеет ряд преимуществ, основные из которых следующие:

1) быстрый рост: они растут гораздо быстрее, чем растения и животные;

2) сокращение сроков, необходимых для производства;

3) высококачественное производство белка на легкодоступных углеводах.

Технология производства БОО основана на глубинном непрерывном методе культивирования в жидких средах.

**Производство биомассы клеток растений.** Культивирование клеток растений основано на применении каллусных клеток (рис. 4.3) [20].



Рис. 4.3. Культура каллусной ткани: эксплант → клетка → каллус

В табл. 4.3 приводятся сведения о каллусе и его свойствах.

Из табл. 4.3 следует, что каллус (от лат. «callus» – мозоль) – это особый тип ткани. Перерождение специализированной клетки растений в каллусную связано с индукцией клеточного деле-

ния, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

Таблица 4.3

Культура каллусной ткани: определения и свойства[20, 34]

<table>
<tr><th>Определение</th><th colspan="2">Свойства</th></tr>
<tr><td>Каллус образуется in vitro в результате неорганизованного и неограниченного роста</td><td>1) популяция клеток in vitro проходит определенные стадии онтогенеза: деление – растяжение – дифференцировка – старение – смерть клеток</td><td rowspan="3">5) гетерогенны:<br>- генетически (отличаются по числу хромосом и генной экспрессии): при длительном культивировании плоидность неуклонно возрастает,<br>- по размеру (от 15–30 у молодых до 500–1000 мкм у старых) и форме,<br>- по возрасту</td></tr>
<tr><td>Каллус представлен скоплениями недифференцированных клеток</td><td>2) осуществляют синтез вторичных метаболитов</td></tr>
<tr><td>Каллус чаще белого или желтоватого, реже – светло-зеленого или темно-коричневого (при старении) цвета</td><td>3) обладают фотопериодической реакцией, морозостойкостью и устойчивостью к высоким температурам</td></tr>
<tr><td>Каллус не имеет конкретной анатомической структуры</td><td>4) имеют удлиненный клеточный цикл, физиологически асинхронны</td><td>6) отличаются незначительным потреблением кислорода</td></tr>
</table>

Требования, предъявляемые к получению каллусной ткани:

1) процесс получения первичного каллуса и дальнейшее её культивирование требует стерильности;

2) простерилизованный *эксплант* (фрагмент ткани растения – корень, стебель, лист, предназначенный для получения каллуса) помещают на подходящую по составу питательную среду для каллусогенеза (процесс образования каллуса);

3) для поддержания непрерывного каллусогенеза каллусную ткань через каждые 3–4 недели роста пассируют (пересаживают) на свежую питательную среду.

Изолированная клетка в жидкой питательной среде приступает к делению только после кондиционирования среды (среда, в которой ранее культивировалась каллусная ткань), а на агаризованной среде – в присутствии «няньки» или при наличии в определенной плотности засева «кормящего слоя». Обязательным условием развития каллусной ткани *in vitro* является присутствие в питательной среде двух классов фитогормонов: *ауксинов*, вызывающих процесс дедифференцировки клетки и *цитокининов*, обуславливающих пролиферацию клеток.

При длительном культивировании каллусные клетки вследствие приобретения способности синтезировать гормоны становятся гормононезависимыми. Такие клетки называются *химическими опухолями*. Они отличаются от генетических опухолей растений по процессу образования: первые образуются в результате привыкания («привыкшие»), вторые – вызываются вирусами или бактериями. Но также, как и генетические опухоли, химические опухоли гормононезависимы, не имеют способность регенерировать фертильные растения, утрачивают способность к вторичной дифференцировке и морфогенезу.

Вторичная дифференцировка может привести к морфогенезу и регенерации растения, гистодифференцировки (тканеобразование), стационарной фазе роста, когда образуются старые неделящиеся каллусные клетки. С биотехнологической точки зрения наибольший интерес представляет путь, ведущий к морфогенезу и регенерации растения (рис. 4.4).

*Морфогенезом в культуре каллусных тканей* называют процесс возникновения организованных структур из неорганизованной массы клеток. Различают три типа морфогенеза, проявляющиеся в виде *гистогенеза* (образование ткани), *органогенеза* (образование отдельных органов: каллогенез – признак побега, ризогенез – инициация корня) или *соматического эмбриогенеза* (образование зародышеподобных структур). В первом случае регенерируют ткани, во втором – вначале отдельные органы, а затем из них целые растения, в третьем – образуется зародыш, из которого в дальнейшем, развивается целое растение.

Соматический эмбриогенез независим от экзогормонов, так как зародышеподобные структуры способны обеспечить себя ими самостоятельно.

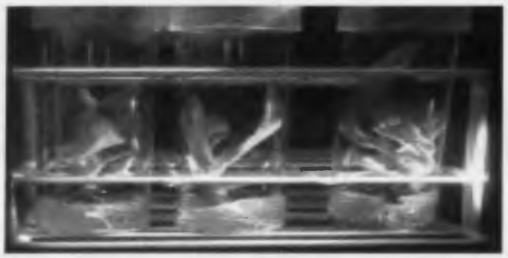


Рис. 4.4. Пробирочная культура

Морфогенез зависит от эндогенных (вид, возраст и орган) и экзогенных (состав питательной среды, температура, свет, pH и др.) факторов, поэтому в культуре каллусных клеток морфогенезом можно управлять.

Основными регуляторами роста и дифференцировки при морфогенезе является соотношение ауксинов к цитокинину (при преобладании ауксинов над цитокинином начинается корневой органогенез, а при преобладании цитокининов над ауксином – стеблевой; рис. 4.5) и способность клеток воспринимать стимулы морфогенеза (компетентность клетки) [34].

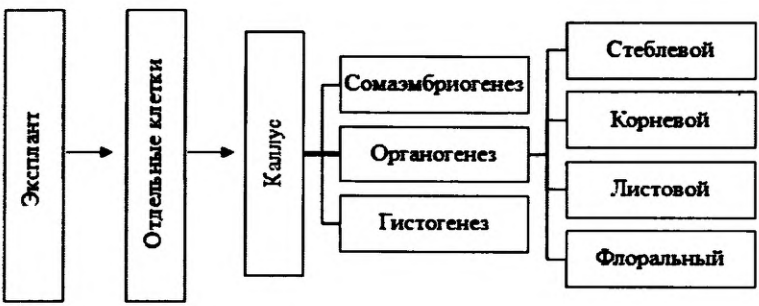



Рис. 4.5. Морфогенез в культуре каллусной ткани

Для морфогенеза каллусной ткани характерно:

1) процесс морфогенеза начинается с обособления клетки (клетка-инициаль), которая:

а) при соматическом эмбриогенезе дает начало зиготе (глобулярное проэмбрио),

б) при гистогенезе и органогенезе – меристематическому очагу:

– глобулярный проэмбрио формирует соматические эмбриоды,

– меристематический очаг дифференцирует зачатки стебля, корня, листа или цветочной почки, что приводит соответственно к стеблевому, корневому, листовому и флоральному органогенезу;

2) процессы морфогенеза в каллусных клетках протекают асинхронно и продолжительно.

**Клеточная суспензия** – это отделенные от каллуса клетки и клеточные агрегаты, используемые в биотехнологии для получения изолированных протопластов, клеточной биомассы, вторичных метаболитов и клеточной селекции.

Получение вторичных метаболитов в промышленных масштабах основано на эксплуатации биореакторов различной конструкции.

При получении клеточных суспензий следует придерживаться некоторых условий, к основным из которых можно отнести:

1) подготовка 2–3 г свежей рыхлой каллусной ткани для получения 100 мл клеточной суспензии;

2) оптимальная плотность клеток в суспензии – $10^5$–$10^6$ клеток на 1 мл среды;

3) культивирование каллуса в жидкой питательной среде;

4) культивирование при постоянном перемешивании питательной среды, что важно для предотвращения образования каллусной ткани;

5) включение фитогормонов (*ауксин, цитокинин, пектиназа*; последний фермент предотвращает склеивание клеточных суспензий) для пролиферации клеточных суспензий.

При успешном культивировании длительность пассажа составляет 14–16 дней. При этом плотность возрастает от 50 тыс. до 500 тыс. кл./мл.

**Биомасса клеток млекопитающих животных**

У млекопитающих спектр клеток, которые можно культивировать, достаточно широк (рис. 4.6) [41].

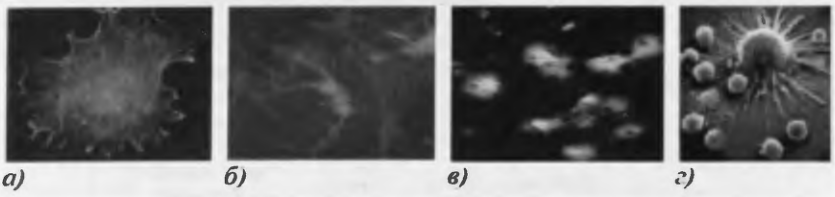



Рис. 4.6. Культура клеток животных

*а) Эндотелиоцит (человек); б) Астроциты (окрашены в синий цвет) и олигодендроциты (красные клетки) в культуре (человек); в) Гепатоциты (бабуин); г) Раковая клетка молочной железы (человек)*

Как видно из рис. 4.6, культивированию подвергаются фибробласты – элементы соединительной ткани; клетки кости и хряща (скелетные ткани); мышечные (гладкая, сердечная, поперечно-полосатая), эпителиальные (печень, легкие, мочевой пузырь, почки), нервные (нейроны, глиальные) и эндокринные (надпочечники, гипофиз) клетки и др., а также опухолевые клетки.

Выбор культуры зависит от содержания эксперимента (все соматические клетки животных в норме имеют диплоидный (2n); гаметы – гаплоидный набор (n) хромосом), технического оформления лаборатории и наличия средств для выращивания культур.

На биологический объект при выборе вида культуры влияют [41]:

1. Тип культуры: культура органов и культура клеток (рис. 4.7).
2. Источник ткани (рис. 4.8): эмбриональная ткань, ткань взрослого организма (постнатальная ткань).
3. Тип ткани: нормальная, опухолевая (рис. 4.9).

**Культура диплоидных клеток** *(штамм ДК)* [1, 41, 72]. Первичные культуры клеток, полученные из нормальных (неопухолевых) тканей и их субкультуры до 5–10 пассажей имеют, как правило, диплоидный набор хромосом.

В соответствии с требованиями Международного Комитета по клеточным культурам, культура диплоидных клеток должна обла-

дать «... морфологически однородной популяцией клеток, стабилизированной в процессе культивирования *in vitro*, имеющая ограниченный срок жизни ... сохраняющая в процессе пассирования кариотип, свойственный генотипу, свободная от контаминантов ...».

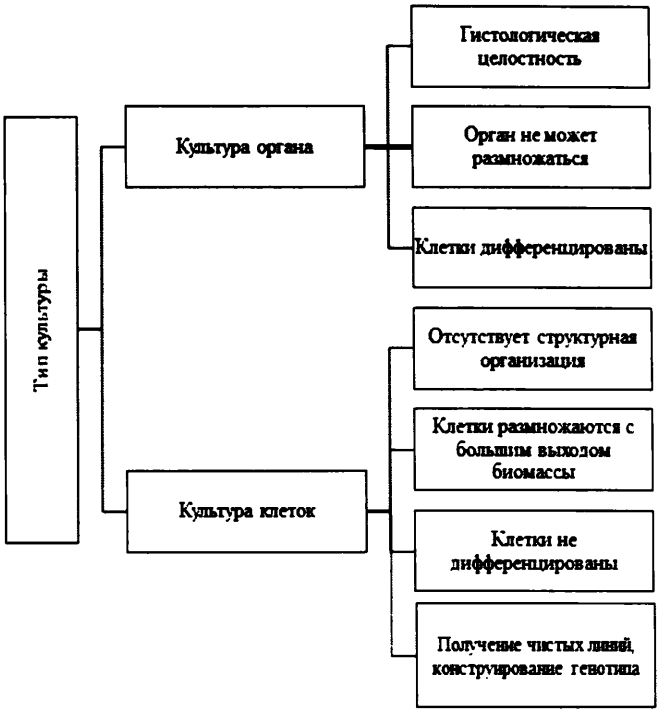



Рис. 4.7. Тип культуры: культура органов и культура клеток

Следовательно, *диплоидная культура клеток* – это экологически чистая клеточная система, обеспечивающая отсутствие возможных посторонних контаминантов.

На сегодня получено большое количество диплоидных штаммов из тканей и органов человека и животных (более 400), которые используются для биотехнологических целей.

В процессе субкультивирования выявляются различия в пролиферативной активности клеток фибробластоподобного и эпителиоподобного типа.




Рис. 4.8. Источник ткани: эмбриональная ткань, ткань взрослого организма (постнатальная ткань)

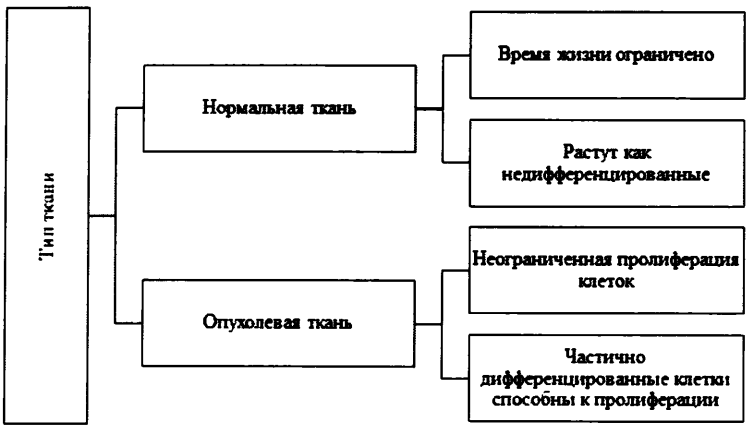



Рис. 4.9. Тип ткани: нормальная, опухолевая

В зависимости от вида животных продолжительность жизни (период жизни) фибробластоподобных диплоидных культур различна, в среднем, она составляет 50±10 пассажей. В оптимальных условиях культивирования диплоидная культура кле-

ток животных эпителиоподобного типа претерпевает, как правило, спонтанную неонкогенную трансформацию и через 65–80 пассажей становится стабильной (постоянной) линией клеток.

**Клеточные линии** [1, 5, 11, 15, 41, 109].По сроку жизни в культуре различают первичные, субкультуральные и постоянные клеточные линии:

1. Первичные культуры. Культура, полученная из ткани и выращиваемая *in vitro* до начала субкультивирования (т. е. до первого посева) называют *первичной*. Первичные культуры получают от кусочков ткани, объемом 1 мм, которые прикрепляются к поверхности субстрата благодаря собственной адгезивности или наличию насечек на чашке, или с помощью сгустка плазмы. Под *биоспецифической адгезией* понимают совокупность процессов взаимодействия между клетками экспрессированных рецепторов, благодаря которым обеспечивается эффективное прикрепление, распластывание, пролиферация, дифференциация и обновление.

2. Субкультуры – культуры, полученные путем пересева клеток первичных культур в свежую питательную среду. Субкультуры практически получают из всех первичных культур. Субкультура культивируется в термостате в течение 5–8 пассажей. Следует отметить, что монослой клеток субкультуры имеет более однородную популяцию клеток, чем первичные культуры.

3. Постоянные (стабильные) клеточные линии. Клеточная линия (Cellline) – культура клеток, возникающая спонтанно или искусственно из первичной культуры после первого пересева, адаптированная к условиям существования вне организма. Если культура способна субкультивироваться только определенное число пассажей, её называют *культурой с ограниченным сроком жизни*, а если культура обладает способностью к неограниченному размножению (субкультивированию), то её называют *постоянной перевиваемой или стабильной клеточной линией*.

Постоянные линии клеток являются объектом исследований по фундаментальной (изучение особенностей поведения клеток в культуре, их взаимодействия с вирусами, хламидиями, простейшими и др. патогенами), экспериментальной (реконструкция клетки) и прикладной (работы по трансформации

клеток, токсикологии и фармакологии, по производству вирус-вакцин) биотехнологии.

Недостатком постоянных линий клеток является их возможная контаминация латентными вирусами и микоплазмами, которые влияют на свойства клеток и могут изменять характер взаимоотношений клеток с вирусами.

В табл. 4.4 представлены наиболее часто используемые постоянные линии эпителиоподобных клеток животных, культивируемые в монослое.

Таблица 4.4

Постоянные перевиваемые линии клеток,полученные из органов и тканей некоторых видов животных [41]

| Наименование | Исходная ткань | Питательная среда | Особенность и краткая характеристика |
|---|---|---|---|
| СПЭВ | почка эмбриона свиньи | 199, с 5–10 % сыворотки крупного рогатого скота | Культура пересевается 2 раза в неделю. Клетки, снятые с одного матраса, можно высеять в 200 пробирок или 4–6 аналогичных матраса. Сбор клеток с одного литрового матраса достигает в среднем 35–40 млн. |
| ПО или ПТ | почка овцы (ПО) или (ПТ) теленка | Игла с 10 % сыворотки крупного рогатого скота | Монослой формируется на 4–5 сут. Пересев осуществляется один (ПО) – два (ПТ) раза в неделю. Линия пассируется более 150 (ПО) или 500 (ПТ) пассажей |
| ТР | трахея эмбриона коровы | Игла с 10 % сыворотки крупного рогатого скота | Клетки образуют монослой на 3–4 сут., пересев проводится два раза в неделю. *«Урожай»* клеток с одного литрового матраса составляет 23–28 млн. |

Как видно из табл. 4.4, наиболее востребованными питательными средами для культивирования клеток животных являются среда Игла и 199.

Наиболее распространенным способом культивирования перевиваемых клеток является метод культивирования их во флаконах.

Для размножения клеток в больших количествах применяют матрасы различной емкости (100 мл –1,5 л). Пересевы клеток осуществляют через каждые 3–4 дня, т. е. после образования сплошного слоя. Для этого из матрасов с выросшим монослоем клеток удаляют питательную среду, промывают монослой теплым (36–37°С) раствором Хэнкса и вносят подогретую до 36 °С смесь растворов Версена (0,02 %) с трипсином (0,25 %) в соотношении 9 : 1 и помещают в термостат при 37 °С на 5–10 мин, за это время матрасы следует несколько раз слегка покачивать.

Существуют два метода пересева после отделения клеток от стекла с помощью диспергирующего раствора: центрифужный и бесценгрифужный.

В первом случае взвесь клеток помещают в центрифужные стаканы и центрифугируют при 800–1000 об/мин в течение 10 мин, во втором – осуществляют выращивание культур в пробирках (концентрация клеток в суспензии должна быть $10^5$ в 1 мл) или матрасах (концентрация клеток $5–10x10^4$ в 1 мл). Матрасы укладывают на полки термостата в горизонтальном положении. Важно, чтобы пробки плотно закрывали матрасы и пробирки, иначе за счет поступления воздуха извне произойдет сдвиг pH среды в щелочную сторону. Последнее обстоятельство неблагоприятно сказывается на росте клеток. Культуры клеток выращивают при температуре 37 °С в стационарных условиях. Полученные перевиваемые культуры растут без смены питательной среды.

При использовании клеточной культуры для работы с вирусами из матрасов и пробирок удаляют ростовую питательную среду и заменяют её поддерживающей средой, не содержащей сыворотки.

При поддержании матричной культуры пересев производится не менее чем в 2 матраса. Один из них служит для последующего пассажа, а второй сохраняется до установления удовлетворительного роста в пассажных культурах.

При обнаружении неравномерного, недостаточного роста, а также дегенеративных изменений в клетках культуры выбраковываются.

Митотическая активность перевиваемых клеточных культур через 24–48 часов культивирования составляет, например, для культур СПЭВ и ПТ – 30–40 %, ПО – 12–16 %. Индекс пролиферации клеток тимуса и почки равен 4–6, а клеток селезенки 2–3 [41].

**Методика получения клеточных культур**. Методика по получению клеточных культур зависит от видовой принадлежности и типа ткани и представлена в табл. 4.5.

Таблица 4.5

Методика получения клеточных культур животных [72, 41]

| № п/п | Этап | Мероприятия | Основной результат |
|---|---|---|---|
| 1 | Подготовка ткани | 1) измельчение на кусочки (размеры 1–3 мм) | Выход клеток из 1 г ткани составляет примерно 40–60 млн. |
| | | 2) отмывание от эритроцитов раствором Хенкса | |
| | | 3) ферментативное разобщение клеток трипсинизацией | |
| | | 4) дезагрегация на магнитных мешалках | |
| | | 5) центрифугирование при 1000 об/мин (10 мин) | |
| | | 6) ресуспендирование осадка клеток в среде, подсчет клеток в камере Горяева | |
| 2 | Засев в культуральные сосуды | Посевная доза клеток в 1 мл среды равно 200–500 тыс. клеток. Для культивирования применяют обычно 0,5 % раствор гидролизат лактальбумина и среду Игла с 10–20 % сывороткой с pH 7,2–7,4. Культивируют в термостат при температуре 37 °С. Смену среды проводят на вторые сутки. Рост клеток и формирование монослоя отмечается на 3–7 сутки | Концентрация клеток в суспензии 0,3 – $10x10^5$ в 1 мл |

продолжение табл. 4.5

| № п/п | Этап | Мероприятия | Основной результат |
|---|---|---|---|
| 3 | Пассаж | В диплоидной культуре в результате митотического деления образуются генетически равноценные дочерние популяции клеток, которые сохраняют диплоидный набор хромосом | ДШ путем пересева поддерживают в течение 50±10 пассажей |

Дополнением для табл. 4.5 является тот факт, что для получения штаммов клеток животного происхождения используют как эмбриональные, так и постнатальные ткани.

При работе с эмбриональными тканями используют эмбрионы 1–3 месяцев, которые получают путем кесарево сечения или доставляют с мясокомбината не позднее 2–3 ч после убоя животного.

Контрольные вопросы

1. Что лежит в основе промышленной биотехнологии и из каких элементов слагается биотехнологический процесс?
2. Этапы биотехнологического производства продуктов: характеристика и концентрация целевого продукта.
3. Виды биотехнологических процессов и производств.
4. Продукты биотехнологического производства и принципы их разделения.
5. Производство биомассы клеток микроорганизмов, растений и животных в сравнительном аспекте.

# 5. ОСНОВЫ ПРОИЗВОДСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Биологически активные вещества (БАВ) – это высокоактивные биохимические вещества (белки, ферменты, гормоны, антибиотики, витамины), способные в клетке:

– воздействовать на молекулярные преобразования веществ;

– обеспечить синтез необходимых веществ;

– изменять скорость обмена веществ.

Основным технологическим требованием для получения БАВ является строгое соблюдение правил асептики.

БАВ успешно зарекомендовали себя в сельскохозяйственной, пищевой, фармацевтической промышленности, медицине, косметологии, в защите окружающей среды при очистке стоков, воздуха и почвы, при переработке отходов, в биогеотехнологиях при биовыщелачивании и биоокислении металлов, при производстве возобновляемых источников энергии и т. д. [5, 8]

Далее рассматриваются классические» методы производства биомассы и БАВ на примере пищевой и фармацевтической биотехнологии.

## 5.1. Основы производства биологически активных веществ в пищевой биотехнологии

Для биотехнологического производства пищевых продуктов используется продовольственное сырье: объекты растительного, животного, микробиологического, а также минерального происхождения, и вода.

В табл. 5.1 дана классификация пищевых продуктов и их продуценты.

Как видно из табл. 5.1, пищевые технологии неразрывно связаны с биотехнологическими процессами.

Для получения общего представления в табл. 5.2 изложены сведения о классических продуцентах, используемых в пищевой промышленности.

Таблица 5.1

Классификация пищевых продуктов и их продуценты [11, 22]

| Пищевые продукты | Краткая характеристика | Примеры | Продуценты |
|---|---|---|---|
| Продукты массового потребления | Производятся по традиционной технологии | Хлебобулочные, молочные, колбасные изделия | Хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Молочнокислые бактерии *Streptococcus, Lactobacillus; Lactobacillus*. Бифидобактерии, Пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium freudenreichiisubspglobosum, P.freudenreichiisubspfreudenreichii, P. freudenreichiisubspshermanii*) |
| Продукты детского питания | Продукты с особыми требованиями по пищевой ценности и безопасности | Сухие молочные биологические активные добавки | Содержат лактоглобулин, живые бифидобактерии, лизоцим или их сочетания |
| Лечебные (диетические) и лечебно-профилактические продукты | Специально созданные с изменен-ным химическим составом продукты | Молоко без лактозы | Производство лактазы из грибов *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae*, дрожжей *Kluyveromyces fragilis* и *Kluyveromyces lactis* и добавлении её в молоко. Фермент расщепляет до 98 % лактозы в молоке |

продолжение табл. 5.1

| Пищевые продукты | Краткая характеристика | Примеры | Продуценты |
|---|---|---|---|
| Функциональные пищевые продукты | Продукты с дополнительными полезными (питательными, оздоровительными, восполняющими, предохраняющими и др.) свойствами для систематического употребления | Пробиотики (пищевой ингредиент в виде полезных микроорганизмов) | Бифидобактерии, лактобактерии, дрожжевые грибки |

Таблица 5.2

Использование микроорганизмов в пищевой промышленности [22]

| Направление | Продукт | Продуценты |
|---|---|---|
| Использование микробных клеток и производство физиологически активных веществ | Пекарские дрожжи | *Saccharomyces cerevisiae, Candida milleri* |
| | Кормовые дрожжи | *Candida utilis, Saccharomyces lipolytica* |
| | Белки одноклеточных | *Methylophilus methylotrophus, Candida tropicalis, C. utilis, romyces lipolytica* |
| | Аминокислоты | *Corynebacterium glutamicum* |
| Производство полисахаридов | Декстраны | *Leuconostoc mesenteroides* |
| | Леваны, маннаны, ксантаны | *Xanthomonas campestris* |
| Сбраживаемые алкогольные напитки и пищевые продукты | Соевый соус | *Aspergillus oryzae, Saccharomyces rouxil, Torulopsis spp* |
| | Уксус | *Gluconobacter suboxydans* |
| | Йогурт | *Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus* |
| | Маринованные овощи, сыры | *Penicillium camemberlii, Propionibacterium shermanii, Streptococcus spp* |

продолжение табл. 5.2

| Направление | Продукт | Продуценты |
|---|---|---|
| Спиртовое брожение | Пиво | *Saccharomyces cerevisiae, S. carlsbergensis, S.uvarum* |
| Спиртовое брожение | Сидр | *S.cidri* |
| | Вино | S. cerevisiae |
| | Сакэ | *Aspergillus oryzae, Lactobacillus, Leuconostoc spp., S.cerevisiae* |
| Сыроделие | Прессованный творог | *Streptococcus lactis, S. cremoris, S. diacetilactis* |
| | Сыры | *Streptococcus lactis, S. cremoris, S. diacetilactis, Brevibacterium linens, Penicillium camembertii, P. candidum* |

Как видно из табл. 5.2, биотехнологическое производство пищевых препаратов основывается на использовании бактерий, плесни и дрожжей:

– при производстве сыра сохраняется питательная ценность молока;

– производство йогурта основано на применении смешанной культуры, состоящей из *Streptococcus thermophilusи Lactobacillus bulgaricus*, масла и сметаны – *Leuconostoc*;

– для производства хлебобулочных изделий применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые культивируют в ферментерах периодического действия на мелассе;

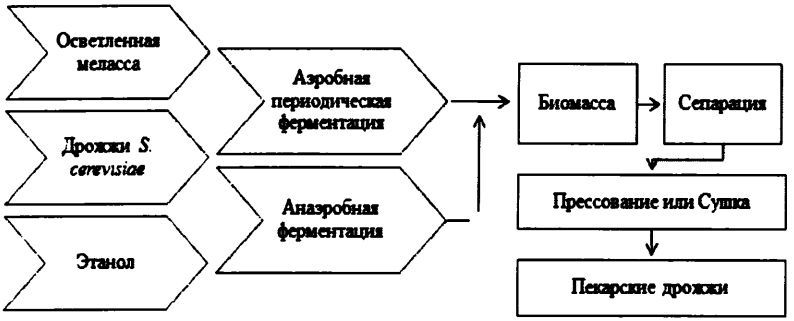
– при производстве мясных изделий широко практикуются бифидобактерии и пропионовокислые бактерии;

– бродильное производство основано на спиртовом брожении рода *Saccharomyces;*

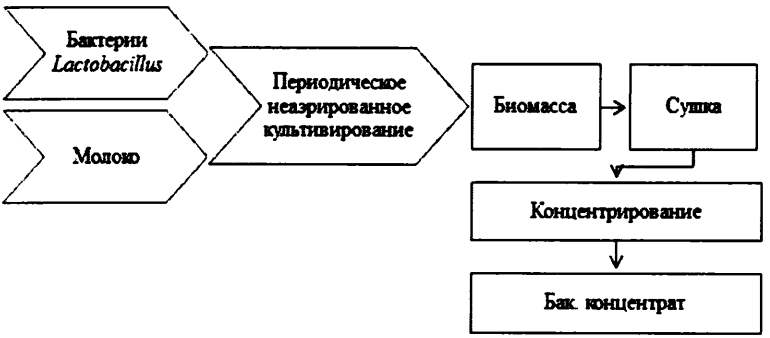
– алкогольные напитки получают путем сбраживания сахаросодержащего сырья, в результате которого образуется спирт и углекислый газ;

– пищевые добавки производятся в виде отдельных аминокислот, подкислителей, придающие продуктам «остроту» вкуса и витаминов.

Блок-схема, представленная на рис. 5.1, показывает биотехнологическое производство биомассы на примере хлебопекарных дрожжей и молочнокислых бактерий.




а) хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*




б) молочнокислые бактерии *Lactobacillus*

Рис. 5.1. Блок-схема биотехнологического производства биомассы в пищевой промышленности

В табл. 5.3 приводятся краткие сведения по производству биомассы в пищевой промышленности.

Как видно из рис. 5.1 и табл. 5.3, технология производства биомассы складывается из трех ключевых мероприятий – это подготовка субстрата (меласса и этанол для пекарских дрожжей, молоко для лактобактерий) и посевного материала, ферментация в биореакторах, сушка и концентрирование продукта.

К наиболее известным промышленным продуктам микробного синтеза относятся аминокислоты (лизин, триптофан, глутаминовая кислота), органические кислоты (лимонная, уксусная, молочная, глюконовая, итаконовая, пропионовая), ароматизаторы и вещества, усиливающие запахи (например, глутамат натрия).

Таблица 5.3

Производство биомассы в пищевой промышленности

| Биомасса | Питательная среда | Условия ферментации | Выход биомассы | Применение |
|---|---|---|---|---|
| Хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* | Меласса* + соли фосфора и азота + сахар 0,5–1,5 % | Аэробная периодическая, 4–6 сут. | 8 г/л при выходе 70 % от использования субстрата | Пищевая промышленность |
| | Этанол + сахар 0,5–1,5 % | Анаэробные | 20 г/л и 50 % соответственно | |
| Молочнокислые бактерии *Streptococcus, Lactobacillus; actobacillus* | Молоко (цельное, обезжиренное, сухое) | Периодический без аэрации при температуре | $1–2x10^9$ клеток в 1 мл среды. При сушке (140 °С) выживаемость составляет 7–33 % | Приготовление молочных и хлебобулочных изделий |
| | | 40 °С в течение 6 ч (молочнокислые палочки) или 30 °С в течение 12–16 ч (молочнокислые стрептококки) | Бак. концентрат пастообразной консистенции: в 1 г 120–500 млрд. жизнеспособных | |

* Меласса – побочный продукт сахарной промышленности, содержит до 86 % сухих веществ, 40–55 % сахарозы

Все аминокислоты, из которых состоят белки, относят к иминокислотам. Их получают в пищевой, фармацевтической и парфюмерной промышленности. Особенность аминокислот, производимых биотехнологическими методами, заключается в их оптической чистоте.

В качестве примера в табл. 5.4 раскрыты и на рис. 5.2–5.4 показаны типовые схемы производства незаменимых аминокислот: L-лизина, L-триптофана и глутаминовой кислоты (L-глутамат).

Таблица 5.4

Биотехнология производства аминокислот

| № п/п | Показатель | Аминокислоты | | |
|---|---|---|---|---|
| | | L-лизин | L-триптофан | L-глутамат |
| 1 | Химическая формула | $C_6H_{14}N_2O_2$ | $C_{11}H_{12}N_2O_2$ | $C_5H_9NO_4$ |
| 2 | Продуценты | Грамположительные мутанты ауксотрофных бактерий родов Brevibacterium, Micrococcus, Corynebacterium и др. | Дрожжи Candidaили Hansunella. | Грамположительные, круглые или овальные бактерии рода Corynebacterium, Brevibacterium. |
| 3 | Субстрат и среда | Среды, содержащие углеводы или уксусную кислоту, источники азота и кислород (меласса и кукурузный экстракт) | Среды, содержащие усвояемые источники углерода (меласса, диффузионный сок сахарной свеклы, сахарозу) | Среда, содержащая мочевину, сахарозу или глюкозу (меласса) |

продолжение табл. 5.4

| № п/п | Показатель | Аминокислоты | | |
|---|---|---|---|---|
| | | L-лизин | L-триптофан | L-глутамат |
| 4 | Биотехнология производства | Количество посевного материала составляет 5–10 %, температура 30–33 °С, pH 7,47. Длится 50–70 ч | Аэробная, длится 5-6 суток. В клетках триптофан синтезируется из антраниловой кислоты | В интенсивно аэрационной среде, при температуре 28–30 °С, pH 6,8–7,5. Длится 48 ч |
| 5 | Выход продукта, г/л | Концентрация 20–40, биомассы – 10–15 | 30–80 | 30–60 |
| 6 | Применение | Пищевая, фармацевтическая промышленность, животноводство | Пищевая, фармацевтическая промышленность, животноводство | Медицина, кормопроизводство |

Как видно из табл. 5.4 и рис. 5.2–5.4, биотехнологическое производство аминокислот процесс многоступенчатый и может осуществляться методами гидролиза (экстракция из гидролизата белка), ферментации и биотрансформации (вначале химическим методом получают предшественников).

Следует отметить, что состав питательной среды для ферментации обогащен нужными компонентами в результате включений определенных добавок.

Из производимых аминокислот 65 % имеют применение в пищевой промышленности, 35 % – в животноводстве (кормовые добавки) и около 5 % – в медицине, фармацевтической промышленности и косметологии. Всего в мире производят аминокислот более 4 млн. т/год, из них примерно 1,5 млн. т/год составляет производство L-глутамата (реализуется по цене 1000 дол. США/тонн, в объеме рынка всего – 1,5 млрд. дол. США),

700 тыст/год – L-лизина, 600 тыс. т/год – L-метионина, 55 тыс. /год L-треонина. Значительная часть предприятий по производству аминокислот сосредоточены в азиатском регионе.

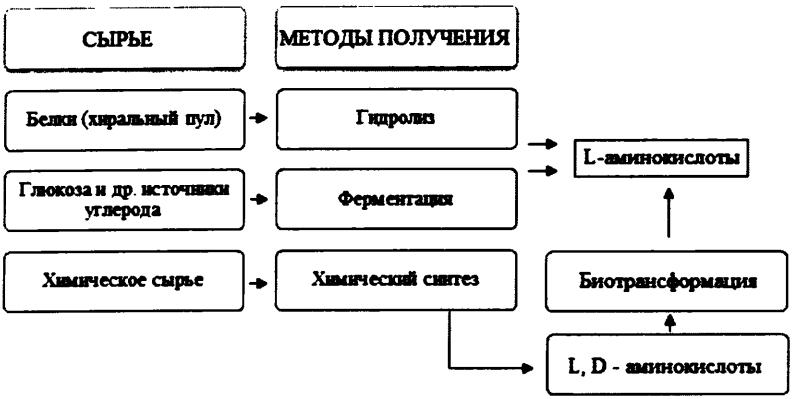



Рис. 5.2. Биотехнология производства L-аминокислот

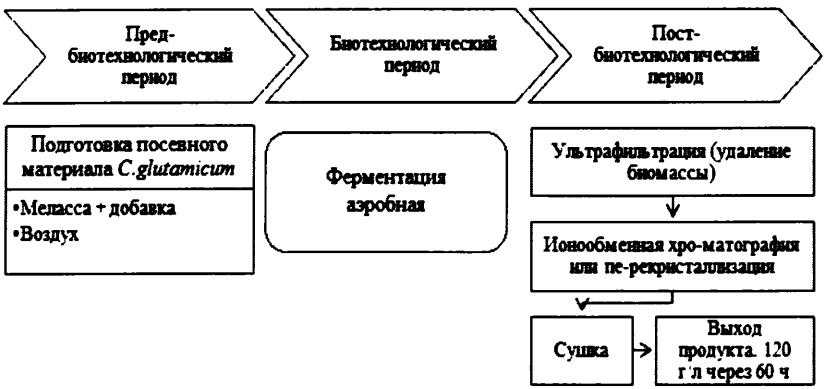



Рис. 5.3. Общая схема производства L-лизина

Для увеличения выхода аминокислот ведутся активные работы в получении рекомбинантных штаммов: так методами генной инженерии получены штаммы-суперпродуценты L-лизина *C. glutamicum*, обеспечивающие выход продукта до 120 г/л через 60 ч ферментации, L-треонина *E.coli*– 80 г/л через 30 ч фермен-

тации. Наряду с ферментационным способом производства аминокислот для животноводства в целях обогащения кормовой ценности в настоящем развивается технология выращивания трансгенных растений с измененным аминокислотным составом.

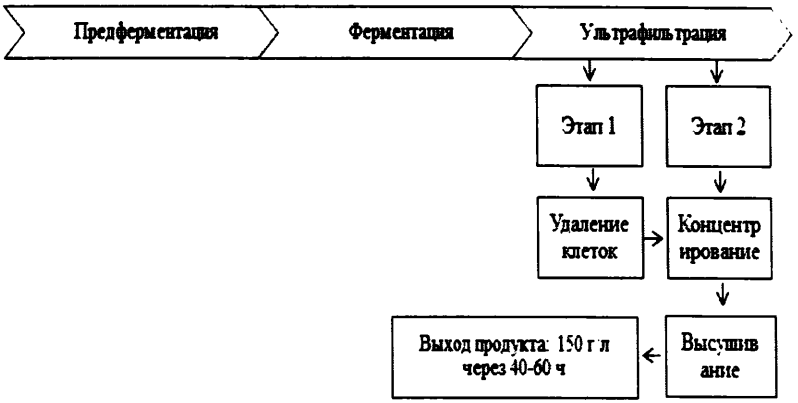



Рис. 5.4. Биотехнология производства L-глутамата

В табл. 5.5 дана краткая характеристика промышленного производства некоторых аминокислот в сравнительном аспекте.

Таблица 5.5

Сравнительная характеристика промышленного производства некоторых аминокислот

| Аминокислота | Продуцент | Сырье | Способ производства | Выход продукта, г/л |
|---|---|---|---|---|
| L-глутамат | *C. glutamicum* | Меласса, гидролизат крахмала | ферментация | 150 |
| L-лизин | *C. glutamicum* | Меласса, кукурузный экстракт | ферментация | 120 |

продолжение табл. 5.5

| Аминокислота | Продуцент | Сырье | Способ производства | Выход продукта, г/л |
|---|---|---|---|---|
| L-метионин | *E.coli* | Акролеин, метантиол, синильная кислота | химический | – |
| L-треонин | *E.coli* | Углеводное растительное | ферментация | 80 |
| L-фенилаланин | *E.coli, коринобактерии* | Углеводное растительное | Ферментация | 50 |
| L-аспарагиновая кислота | *E.coli* | Фумаровая кислота в присутствии аммиака | Ферментация, где клетки иммобилизованы на полиакриламиде | 140 |
| Аспартам | Выделяют фермент из *Bacillus thermoproteolyticus* | Из L-фенилаланина и L-аспаргиновой кислоты | Биокатализ при 70 °С; иммобилизация фермента | 30 |

Как видно из табл. 5.5, метионин производят в основном химическим путем, тогда как другие аминокислоты – ферментационным.

На рис. 5.5 показана блок-схема, а в табл.5.6 кратко охарактеризованы биотехнологии производства органических кислот – молочной, лимонной и уксусной.

Из рис. 5.5 видно, что биотехнология производства органических кислот складывается из трех ключевых процедур – предферментации, ферментации и очистки.

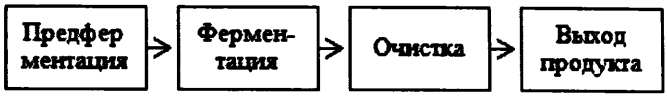



Рис. 5.5. Блок-схема производства органических кислот

Следует отметить, что при производстве:

– молочной кислоты после ферментации для очистки продукта проводят осаждение кальциевой соли, переосаждение или перекристаллизацию;

– лимонной кислоты после ферментации для удаления мицелия используются вращающиеся фильтры, а очистка продукта осуществляется осаждением ($CaOH_2$, $H_2SO_4$) и перекристаллизацией, выход продукта составляет при этом 200 г/л через 150 ч ферментации;

– уксусной кислоты после ферментации для получения пищевого уксуса, раствор пропускают через мембранные фильтры, пастеризуют и разводят до 5 %-й концентрации.

Таблица 5.6

Сравнительная характеристика промышленного производства некоторых органических кислот

| Органическая кислота | Продуцент | Сырье | Способ производства | Производительность |
|---|---|---|---|---|
| Молочная кислота | Lactobacillus | Молоко | Ферментация периодическая без аэрации (6–12 ч) | 2–3 кг/($м^3$ч) |
| Лимонная кислота | A.niger | Крахмал, меласса, источник азота, соли | Аэробная ферментация | 100 г/л |
| Уксусная кислота | Уксуснокислые бактерии: Acetobacter | Этанол (для пищевой) Этилен, метанол (для технических нужд) | Аэробная ферментация | 1,6 г/л |

Интерпретируя данные, представленные в табл. 5.6, можно отметить, что в пищевой промышленности столовый уксус (5 %-й раствор уксусной кислоты) получают из этанола, для борьбы с обледенением на автодорогах производят «ледяную уксусную кислоту» (99,7 %-й раствор уксусной кислоты) из метанола или этилена. Лимонная кислота как подкислитель и консервант используется в пищевой промышленности, как комплексообразователь – в металлургии, как средство для смягчения воды – при производстве стиральных порошков.

В мире производят более 1 млн.т молочной и лимонной кислоты, несколько млрд. литров в год уксусной кислоты. Из производимой молочной кислоты более 85 % используется в пищевой промышленности, остальные – в таких отраслях промышленности, как кожевенном и текстильном, химическом (сырье для синтеза биоразлагаемого полимера – полиэфирного волокна).

**Производство нуклеозидов и нуклеотидов.** Ежегодно производство ионозин-51'-монофосфата, гуанозин-5'-монофосфата и ксантин-5'-монофосфата (соответственно ИМФ, ГМФ, КМФ), используемых для улучшения вкусовых качеств пищи, достигает несколько тысяч тонн в год. Способ производства основан на ферментации штамма-продуцента *C.ammoniagenes* в гидролизат-крахмале при температуре 30 °С pH 6 в течение 42 часов. Выделение продукта осуществляют вначале осаждением при pH 11, затем – перекристаллизацией. Выход продукта достигает 30 г/л.

## 5.2. Основы производства биологически активных веществ в фармацевтической биотехнологии

В фармацевтической промышленности методами биотехнологии успешно производят генно-инженерные белки (инсулин, интерфероны, интерлейкины, вакцины против гепатита и др.), ферменты, диагностические средства (тест-системы на наркотические, лекарственные вещества, гормоны и т.п.), витамины, антибиотики.

**Производство антибиотиков**. Антибиотики (подавители роста микроорганизмов, вызывающие их гибель) – первые лекарственные препараты, полученные биотехнологическим способом.

На рис. 5.6 показана классификация антибиотиков на основе их химического строения.

Как видно из рис. 5.6, в зависимости от химического строения различают восемь классов антибиотиков.

Антибиотик может быть микробного, животного или растительного происхождения. На сегодня выделено более 8000 антибиотиков из микроорганизмов и примерно 4000 – из животных, растений и лишайников. Промышленным способом производят на сегодня примерно 200 антибиотиков.




Рис. 5.6. Антибиотики: классификация на основе химического строения

В медицине, ветеринарии и растениеводстве антибиотики с успехом применяются как противомикробные и противоопухолевые препараты (табл. 5.7).

Из табл. 5.7 видим, что промышленно производимые антибиотики также образуют группы в зависимости от продуцента.

Таблица 5.7

Промышленные продуценты антибиотиков (Прищеп Т. П., 2006)

| Группа | Продуцент | Название антибиотика |
|---|---|---|
| Антибиотики, образуемые бактериями | *Bacillus brevis* | Грамицидин С |
| | *Bacillus polymyxa* | Полимиксины |
| | *Bacillus licheniformis и B. erevis* | Бацитрацины |
| | *Streptococcus lactis* | Низин |
| Антибиотики, образуемые актиномицетами | *Streptomyces griseus* | Стрептомицин |
| | *Streptomyces fradiae* | Неомицин |
| | *Streptomyces kanamyceticus* | Канамицин |
| | *Micromonospora purpurea* | Гентамицин |
| | *Micromonospora inyoensis* | Сизомицин |
| | *Streptomyces tenebraris* | Тобрамицин |
| | *Streptomyces aureofaciens* | Хлортетрациклин |
| | *Streptomyces rimosus* | Окситетрациклин |
| | *Streptomyces noolosus* | Амфотерецин В |
| | *Streptomyces aureofaciens* | Тетерациклин |
| | *Streptomyces venezuelae* | Хлорамфеникол |
| | *Saccharopolyspora erythraea* | Эритромицин |
| | *Streptomyces ambofaciens* | Спирамицин |
| | *Streptomyces fradiae* | Тилозин |
| | *Streptomyces noursei* | Нистатин |
| | *Streptomyces levoris* | Леворин |
| Антибиотики, образуемые грибами | *Penicillium chrysogenum* | Пенициллины |
| | *Cepholosporium acremonium* | Цефалоспорин |
| | *Trichoderma polysporum* | Циклоспорин |
| | *Penicillium griseofulvum* | Гризеофульвин |
| | *Fusidium coccineum* | Фузидин |

Процесс усовершенствования производства антибиотиков протекает в трех направлениях:

1) селекция культур,

2) индуцированный мутагенез и

3) генно-модифицированные технологии, направленная на элиминацию системы обратного подавления синтеза антибиотиков.

На сегодня производят большое количество полусинтетических антибиотиков.

Направленное изменение структуры антибиотика позволяет расширить спектр действия и, в частности, снять проблему устойчивости к антибиотикам.

В настоящее время практикуется три основных биотехнологических способа производства антибиотиков:

1. Прямая ферментация (глубинная культура), основанная на использовании микроорганизмов (на примере, *Penicillum*), которые синтезируют биологически активные соединения в присутствии подходящих ингибиторов метаболизма (табл. 5.8).

Таблица 5.8

Схема производства антибиотиков с краткой характеристикой [7, 117, 193]

| Процесс | Субстрат | Продуценты | Ферментация | Постферментация |
|---|---|---|---|---|
| Краткая характеристика | Меласса, лактоза, сосевая мука | Актиномицеты | Идиофаза – фаза синтеза антибиотиков | Биомасса удаляется центрифугированием. Из среды продукция – экстракцией. Очищают антибиотики хромотографически или перекристаллизацией |

Исходя из табл. 5.8, можно отметить, что антибиотики – это внеклеточные продукты аэробного обмена веществ.

2. Мутационный биосинтез, когда мутанты организмов-продуцентов легко превращают предшественник в аналог антибиотика (рис. 5.7).

Как видно из рис. 5.7, многократное повторение актов мутагенеза с последующим скринингом способствует повышению выхода продукта в $10^3$–$10^6$ раз по сравнению с диким штаммом [237].

3. Генно-инженерная модификация штаммов микроорганизмов для производства антибиотиков.Технология клонирования генов биосинтеза антибиотиков происходит по схеме, представленной на рис. 5.8.

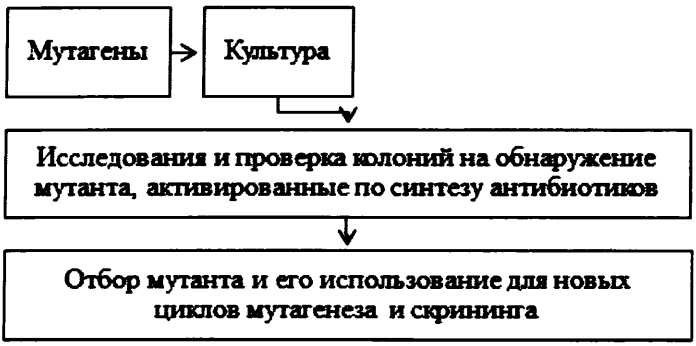



Рис. 5.7. Повторяющие циклы индуцированного мутагенеза

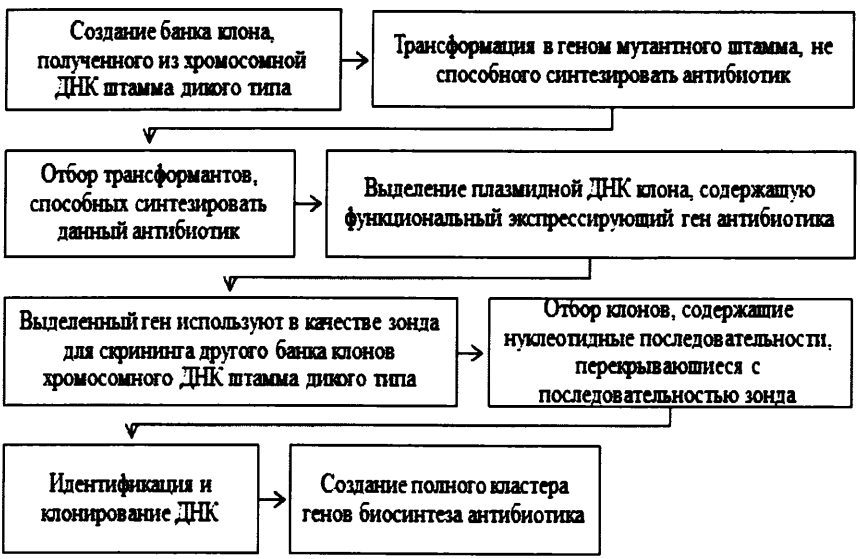



Рис. 5.8. Технологическая схема конструирования генов биосинтеза антибиотиков

На рис. 5.8 приведена технологическая схема производства антибиотика, синтезируемого штаммами *Streptomyces* (подавляющее большинство основных антибиотиков продуцируется данным микроорганизмом; рис. 5.9), трансформированными плазмидами pIJ2303 и pIJ2315.

Из рис. 5.9 следует, что наиболее широко используемыми продуцентами являются актиномицеты.

На рис. 5.10–5.11 в качестве примеров рассматриваются блок-схемы технологии производства некоторых антибиотиков.

Как видно из рис. 5.10, технологический процесс со штаммами культур *Penicillum chrysogenum* осуществляется по схеме размножение спор, выращивание мицелия → ферментация → очистка продукта.

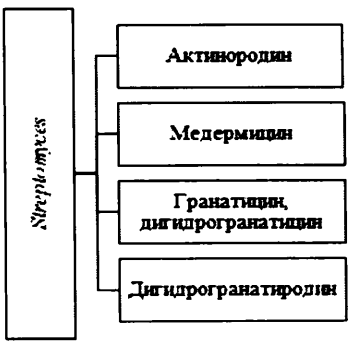



Рис. 5.9. Антибиотики, синтезируемые различными штаммами *Streptomyces*

Интерпретируя изображение на рис. 5.11 следует отметить, что ферментация *Streptomyces orchidaceus* может осуществляться на отходах переработки сои, обработка осуществляется вначале экстракцией 1-бутанолом, затем применяют метод ионообменной хроматографии. Выход продукта 9 г/л.

По аналогии схемы, представленной на рис. 5.11, производят методом ферментации другие классы антибиотиков. Основными различиями в общей схеме являются:

– при производстве аминогликозидных антибиотиков основная ферментация *Streptomyces* в субстрате, включающем

глюкозу, декстрины, соевую муку и микроэлементы, происходит аэробно и непрерывно при температуре 30 °С в течение 120 ч, отделение биомассы осуществляют закислением среды до pH 2, для очистки также применяют метод ионообменной хроматографии, выход продукта составляет 10 г/л;

– при производстве хлортетрациклина основная ферментация *Streptomyces* в жидком кукурузном экстракте осуществляется аэробно при температуре 28 °С, pH 5,8–6 в течение 140 ч, отделение биомассы осуществляют методами фильтрации или сепарации, для очистки также применяют метод ионообменной хроматографии, выход продукта составляет 10 г/л;

– при производстве эритромицина основная ферментация *Saccharopolyspora erythraea* в субстрате, включающем глюкозу, соевую муку и микроэлементы, осуществляется непрерывно при температуре 33 °С, pH 5,8–6 в течение 70 ч, отделение биомассы осуществляют методами фильтрации или сепарации, для очистки применяют метод ионообменной хроматографии, выход продукта составляет 7 г/л.

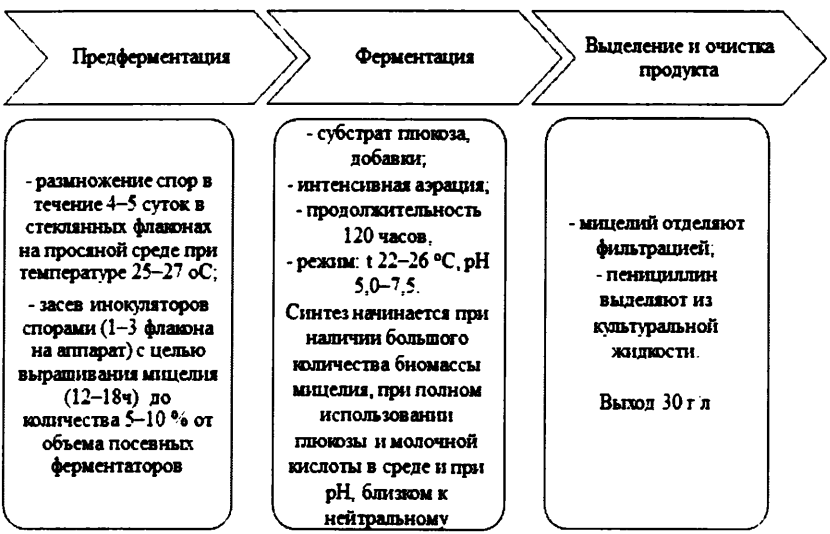



Рис. 5.10. Блок-схема производства β-лактамных антибиотиков (пенициллин)

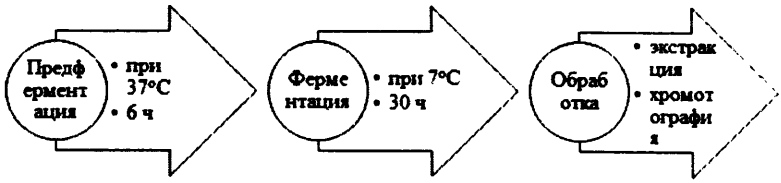



Рис. 5.11. Блок-схема производства антибиотиков – производных аминокислот (бацитрацин)

**Производство витаминов**

Из производства продуктов второй фазы целесообразно рассмотреть также примеры, касающиеся производства витаминов.

Микроорганизмы содержат много витаминов, которые чаще всего входят в состав ферментов. Состав и количество витаминов в биомассе зависят от биологических свойств данной культуры микроорганизмов и условий ферментации.

По способности синтезировать витамин культура может быть аутотрофной (способна синтезировать) и аутогетеротрофной (не способна синтезировать).

С использованием микроорганизмов получают витамины $B_2$ (рибофлавин), $B_{12}$ (цианокобаламин), С (L-аскорбиновая кислота).

Штаммами-продуцентами для них являются, соответственно, *Ashbyagossypii* (суперпродуцент), *Pseudomonas denitrificans* и *Corynebacterium spp.* Субстратами для ферментации служат меласса и аммонийные соли для витаминов $B_2$ и $B_{12}$, D-глюкоза – для витамина С.

Биоиндустриальное производство витаминов рассмотрим на примере витаминов группы В (табл. 5.9).

Таблица 5.9

Биотехнологическое производство витаминов группы В

| № п/п | Показатель | Витамины группы В | |
|---|---|---|---|
| | | $B_2$ | $B_{12}$ |
| 1 | Продуценты | *Ashbyagossypii* | *Pseudomonas denitrificans* |

продолжение табл. 5.9

| № п/п | Показатель | Витамины группы В | |
|---|---|---|---|
| | | $B_2$ | $B_{12}$ |
| 2 | Среда | Среду готовят из 1–3 % мелассы, глюкозы, 3–8 % кукурузного экстракта или дрожжевого автолизата, добавляя N, P2O5, K, Mg, Zn | На среде, содержащей 1 % гидролизата казеина, 1 % пептона, 1,25 % лактата натрия, 0,3 % дрожжевого экстракта, соли кобальта и 5,6-диметилбензимидазол |
| 3 | Режим | Глубинная интенсивно аэрированная ферментация при температуре 29–30 °С, продолжительность 72 ч | Глубинная аэробная ферментация продолжительностью120 ч |
| 4 | Выход продукта | 15 г/л | 150 мг/л |

Как видно из табл. 5.9, производство витаминов (на примере группы В) основано на аэробной глубинной ферментации.

**Производство ферментов.** Биотехнологическое производство ферментов направлено для осуществления ферментативной трансформации (биокатализаторы химических превращений веществ) в различных отраслях промышленности.

По типу реакций различают 6 классов ферментов – оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы, из которых широко используются в промышленной биотехнологии изомеразы и гидролазы вследствие отсутствия у них кофакторной зависимости.

Общая схема биотехнологического производства ферментов представлена на рис. 5.12.

Продуцентами для получения ферментных препаратов являются микроскопические грибы, бактерии и дрожжи. Применение ферментов в химической технологии обусловлено их высокой избирательностью и стереоспецифичностью.

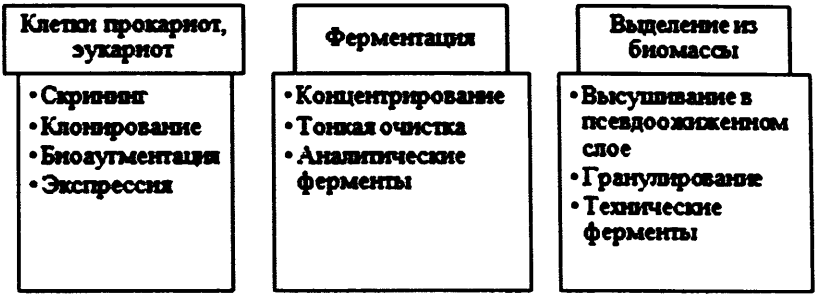


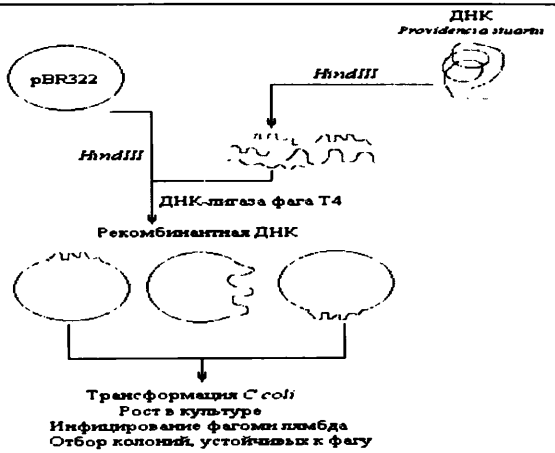

Рис. 5.12. Блок-схема производства ферментов

В табл. 5.10 в качестве примера представлены характеристики технологии получения рестриктазы PstI грамотрицательной бактерии *Providencias tuartii.*

В табл. 5.11 обобщена информация о производстве ферментов биотехнологическим способом.

Таблица 5.10

Характеристики технологии получения рестриктазы PstI грамотрицательной бактерии *Providencias tuartii* [142]

| № пп | Показатель | Характеристика |
|---|---|---|
| 1 | Стратегия выделения и клонирования |  |

продолжение табл. 5.10

| № п/п | Показатель | Характеристика |
|---|---|---|
| 2 | Размер встроенного фрагмента | 4 kb. Экспрессируемый ген придает клетке устойчивость к литическому действию фагов типа λ |
| 3 | Уровень экспрессии гена | В 10 раз выше, чем в *Providenciastuartii*. Последовательность экспрессии сохраняется: вначале синтезируется метилаза, затем – рестриктаза |
| 4 | Секреция | Рестриктаза в периплазматическое пространство, метилаза – в цитоплазму |

Как видно из табл. 5.11, спектр использования ферментов широк – от медицины до химических технологий в промышленности.

Таблица 5.11

Ферменты и их применение

| Фермент | Применение | Продуцент |
|---|---|---|
| Амилазы | Гидролиз крахмала в декстрины, мальтозу и глюкозу; утилизация крахмала; осахаривание крахмалистого материала для спиртового брожения | *Bacillus sp., Aspergillus niger, A. oruzae* |
| Протеазы | Лизис растительных и животных белков; производство и созревание сыра; приготовление соевого соуса и получение аминокислот; выделка кожи. Активаторы пищеварения. Удаление белковых комков в ферментируемых алкогольных напитках; размягчение мяса | *Bacillus licheniformis, B. subtilis, Aspergillus spp., Saccharomyces cerevisiae* |

продолжение табл. 5.11

| Фермент | Применение | Продуцент |
|---|---|---|
| Реннин | Свертывание молока | *E.parasitica, Mucor sp.* |
| Липазы | Производство масла и глицеридов; активаторы пищеварения | *Saccharomycopsis lipolytica* |
| Пектиназы | Осветление вина и фруктовых соков | Грибы *Aspergillus spp.* |
| Гемицеллюлазы, целлюлазы | Гидролиз целлюлозы в глюкозу | Грибы *Trichoderma reesii* |
| Инулаза | Получение инвертированного сахара (смесь глюкозы с фруктозой) из сахарозы | *Saccharomyces cerevisiae* |
| Глюкозоизомераза | Изомеризация глюкозы во фруктозу (высокофруктозный кукурузный сироп) | *Bacillus sp.* |
| Глюкозооксидазаи каталаза | Удаление кислорода для антисептики пищевых продуктов; получение обезвоженного яичного порошка (удаление глюкозы) | *Corynebacterium spp.* |
| Уреаза | Разрушение мочевой кислоты | *Streptomyces* |
| Аспартаза и фумараза | Получение аспартата из фумаровой кислоты и яблочной кислоты из фумаровой кислоты | *Bacillus sp.* |

Следует отметить, что использование ферментов в пищевой промышленности требует специального разрешения от Международной ассоциации производителей ферментов для пищевой промышленности (AMFEP), при этом разрешено использование ферментов растительного и животного происхождения, а также от *«безопасных»* микробных штаммов.

Многие проблемы медицины решаются с применением генотипов с модифицированным геномом. Методами генной инженерии в клетки *E. coli* введён ген, кодирующий синтез α-антитрипсина че-

ловека, ингибирующего активность эластазы. Его образование бактериями достигает 15 % синтеза всех клеточных белков. С 1982 г. производят инсулин человека, также выделяемый из культуральной жидкости *E. coli* (рис. 5.13).




Рис. 5.13. Биотехнология производства инсулина человека в клетках *E. coli*

Интерпретируя изображение на рис. 5.13, следует отметить, что проинсулин *E. coli* синтезируется в комплексе с белком триптофансинтазой, которую при обработке отщепляют протеолизом.

Лимфокины, иммуноглобулины (Ig) и многие другие медицинские препараты также получают с помощью рекомбинантных микроорганизмов, в которые введены соответствующие гены человека.

Применение методов генной инженерии оправдано в случаях, когда невозможно культивировать микроорганизм-продуцент (возбудители сифилиса, проказы, малярии не растут на искусственных средах), высока опасность заражения при работе с патогенными микроорганизмами (ВИЧ) и высока стоимость продуктов, получаемых традиционными методами.

Для получения вакцин или диагностических препаратов в первом случае нужные гены, которые выделяют и встраивают в геном легко культивируемых микроорганизмов (например, в геном кишечной палочки), во втором – вначале идентифицируют возбудителя, а затем встраивают кодирующие их гены в ге-

номы безопасных микроорганизмов (например, p24, gp41, gp120), в третьем, для снижения себестоимости продукции – конструируют рекомбинантные штаммы, которые продуцируют, например многие цитокины (α-интерферон, ИЛ, миелопептиды) и гормоны (инсулин, соматотропный гормон).

В табл. 5.12 обобщены некоторые сведения по получению рекомбинантных белков, предназначенных для инфекционных заболеваний, злокачественных новообразований и гормональной недостаточности.

Таблица 5.12

Рекомбинантные макромолекулы терапевтического назначения

| Возможное терапевтическое применение | Рекомбинантный белок | | |
|---|---|---|---|
| Злокачественное новообразование, иммунные заболевания | Интерлейкины | Факторы: активирующий макрофаги, некроза опухоли | Колониестимулирующий фактор |
| | Интерферон | | |
| | Лимфотоксин | | Тиреотропный гормон |
| Инфекционные заболевания | Интерферон (α,β,γ) | Бактерицидный белок, повышающий проницаемость | |
| Гормональная недостаточность | Соматотропин | Инсулиноподобный фактор роста | Хорионический гонадотропин |
| | Инсулин | | |
| | Соматолиберин | Соматомедин С | Адренокортикотропный |

Контрольные вопросы

1. Биологически активные вещества (БАВ): биохимическая природа и принципы их работы.
2. Особенности воздействия биологически активных веществ на клетки.
3. Классификация биологически активных веществ.
4. Коммерческие принципы производства биологически активных веществ.

5. Особенности биотехнологии производства пищевых БАВ.

6. Особенности биотехнологии производства фармацевтических БАВ.

7. Блок-схемы производства пищевых и фармацевтических БАВ в сравнительном аспекте.

## II. БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ОТРАСЛЯХ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Ведущей отраслью экономики Казахстана является промышленность. Увеличение объемов производства – узловой фактор экономического роста республики. На сегодня основная доля промышленного производства в Казахстане приходится на нефтегазовую отрасль (50,3%), далее следуют цветная металлургия (11,7%), пищевая промышленность (8,1%), черная металлургия (7,2т%), энергетика (5,5%) и другие отрасли.

Основные природопользователи крупнейших промышленных производств – это:

– горнодобывающие предприятия, осуществляющие добычу рудных и нерудных полезных ископаемых открытым, подземным, комбинированным способами, осуществляющие также обогащение полезных ископаемых;

– нефтедобывающие предприятия на суше и в море;

– предприятия черной и цветной металлургии;

– металлургические предприятия, осуществляющие извлечение ценных металлов подземным скважинным и кучным способами;

– предприятия химической промышленности и нефтехимии;

– предприятия энергетической промышленности;

- машиностроительные предприятия и др.

Особенность промышленного сектора – технология производства неразрывно связана с техногенным воздействием на окружающую среду:

– при разработке недр;

– при строительстве и эксплуатации промышленных, военных и гражданских объектов, ирригационных и линейных сооружений;

– при дорожном и индустриальном строительстве населенных пунктов и ирригационных сооружений;

– при организации свалок и полигонов вокруг населенных пунктов; при многотоннажном накапливании отходов производства;

– при загрязнении объектов окружающей природной среды токсичными веществами.

Одним из важных решений по производству продуктов промышленных производств (по отраслям) может быть биотехнология, которая в состоянии для некоторых отраслей предложить безотходные технологии (например, возобновляемая энергетика, биотехнология обессеривания углей и др.), но которая, к сожалению, пока еще не может полностью заменить традиционные методы производства биопроизводством. При этом активные «попытки проникновения» в промышленный сектор экономики через разработку *«зеленых»* технологий уже экспериментально осуществляются. Другим важным решением в борьбе с загрязнением окружающей среды от промышленных объектов, безусловно. является биотехнология, которая для защиты природной среды все чаще стало предлагать биореконструкционные интенсивные *«зеленые»* технологии очистки и восстановления нарушенных экосистем.

# 6. БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

## 6.1. Биотехнология в традиционной энергетике

К традиционной энергетике относятся тепловая, гидро- и атомная энергетика. Непосредственно в технологии получения энергии традиционным способом биотехнологические методы не применяются, однако в решении экологических проблем и рационального использования природных ресурсов в своей отрасли применяются и имеют большие перспективы. Так, например, в нашей стране энергетические корпорации часто включают в состав угледобывающее предприятие и электростанцию. В мировой практике биотехнологические методы перспективны в технологии добычи угля. В улучшении качества угля заинтересованы энергетики, а добыча угля относится к горнодобывающей отрасли. В этой связи рассматриваемые биотехнологии могут быть изложены в разделах, посвященных отраслям, тесно переплетаемых с отраслями-потребителями.

### *6.1.1. Биотехнология в тепловой энергетике*

Тепловая электростанция (или тепловая электрическая станция) – электростанция, вырабатывающая электрическую энергию за счет преобразования химической энергии *топлива* в механическую энергию вращения вала электрогенератора. В качестве топлива используется уголь, торф, природный газ, мазут, горючие сланцы.

На рис. 6.1 представлена классификация теплоэлектростанций.

В данной отрасли методами биотехнологии решаются экологические вопросы, так как в результате сжигания топлива в атмосферный воздух валово выбрасываются загрязняющие вещества: пыль, оксиды серы, углерода, азота. Специфическим загрязняющим веществом является пентаоксид ванадия, который концентрируется в сточной промывной воде.

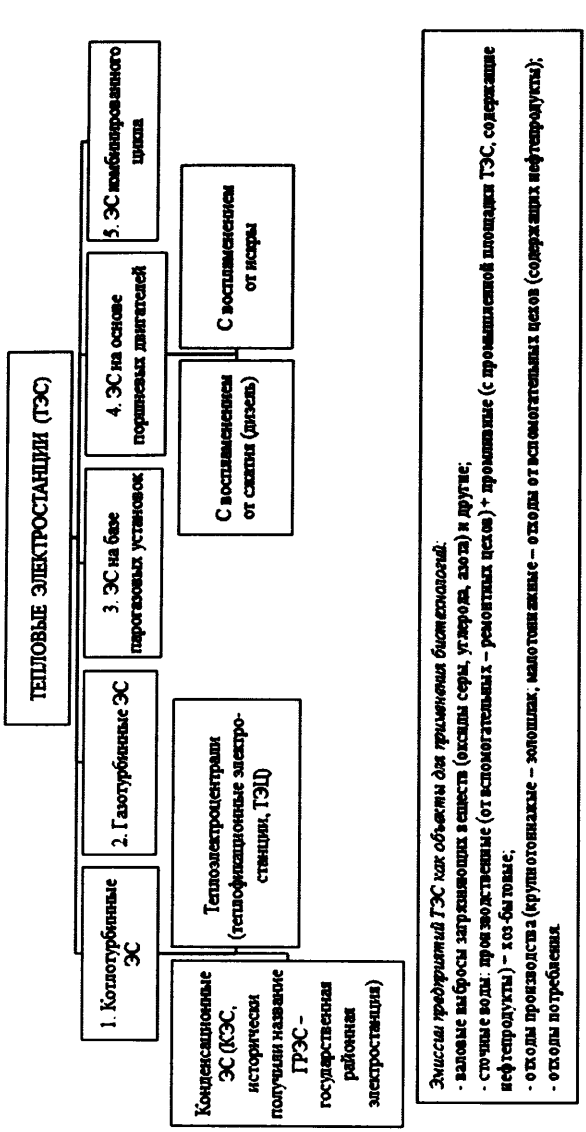



Рис. 6.1. Классификация ТЭС

Образуются сточные воды, среди которых – нефтьсодержащие промливневые воды, для которых применимы методы биотехнологии.

Образуются крупнотоннажные отходы – золошлаковые отходы.

Ниже рассматриваются биотехнологические методы очистки выбросов, сбросов и твердых отходов производства, образуемых при эксплуатации ТЭС.

**Биотехнология очистки выбросов.** В процессе ужесточения контроля состава выхлопных и отработанных газов при эксплуатации ТЭС возможно применение различных методов биотехнологии очистки выбросов, которые основываются на способности микроорганизмов переводить газообразные вещества в водорастворимые формы, разрушать и преобразовывать различные соединения.

На рис. 6.2 показана упрощенная схема комплексной биотехнологии очистки выбросов и стоков, а в табл. 6.1 – раскрывается краткая характеристика и принцип работы биоскруббера.

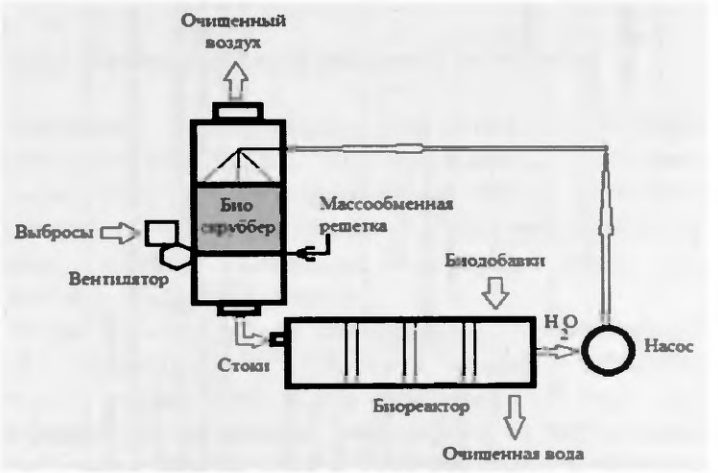



Рис. 6.2. Упрощенная схема комплексной биотехнологии очистки выбросов и стоков

Как видно из рис. 6.2, процесс биотехнологии очистки выбросов решается комплексно и реализуется в два этапа в двух различных установках:

– сначала в биоскрубберах очищение воздуха происходит путем абсорбирования загрязняющих веществ в абсорбенте водой и деструкции илом;

– затем загрязненная вода поступает в биореактор, где она подвергается регенерации.

**Биотехнология очистки сбросов.** Биотехнология очистки нефтьсодержащих стоков включает каскад последовательных процессов очистки, упрощенный принцип которого сводится к выполнению трех ключевых процедур: на начальном этапе осуществляют удаление нефтепродуктов (сорбция) и других взвешенных веществ (фильтрация), после чего на иловых площадках или в аэротенках осуществляют аэробную очистку сточных вод, на завершающем, для возможности повторного использования уже очищенной воды, обеззараживание.

Схема аэробной очистки сточных вод активированным илом показана на рис. 6.3–6.4 и охарактеризована в табл. 6.2.

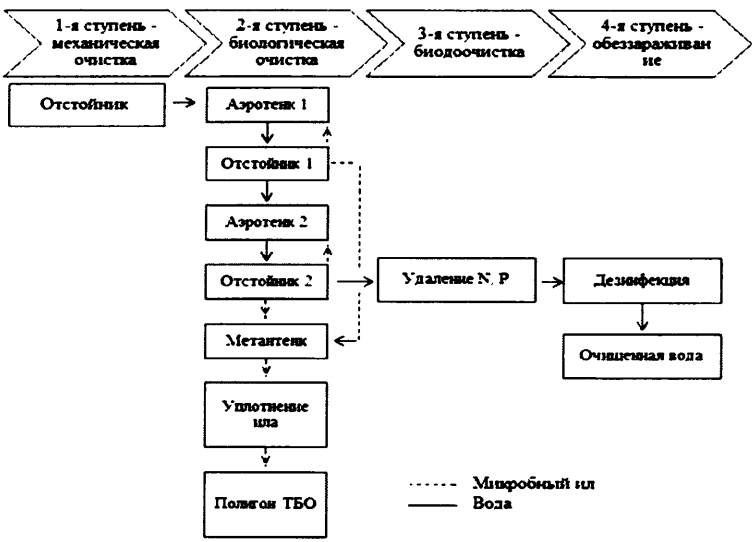



Рис. 6.3. Аэробный метод очистки сточных вод с использованием активированного ила

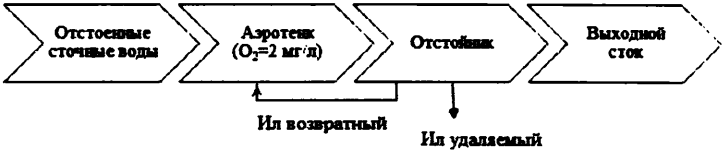



Рис. 6.4. Аэробный метод доочистки сточных вод

Как видно из рис. 6.3 и табл. 6.2, процесс аэробной очистки стоков активированным илом включает четыре ступени. При этом следует отметить, что от степени и качества загрязнения технология очистки может существенно меняться.

Таблица 6.2

Интенсивная аэробная очистка стоков активированным илом

| Этап | Процесс основной | Аппаратурное оформление, результат |
|---|---|---|
| Удаление твердых включений с помощью решеток или первичных отстойников | осветление сточных вод от механических примесей в отстойниках | удаляется до 30 % загрязнений |
| Аэробная биологическая очистка осветленных сточных вод: аэротенк → генератор активного ила → вторичные отстойники. | Суспензия ила в сточной воде в аэротенке подвергается аэрации воздухом. Вода и активный ил разделяются во вторичном отстойнике (осветление жидкости и уплотнение ила) | Органические загрязнители удаляются до 99 %. Избыток ила направляется на анаэробную обработку в метантенк (удаляется 20–30 % легко разлагаемых органических веществ) |
| Биодоочистка сточных вод | биологические пруды, фильтровальные станции | Удаляется азот и фосфор |
| Обеззараживание | дезинфекция | хлорирование, озонирование |

**Биоутилизация зольно-шлаковых отходов.** По оценкам экспертов, на территории Казахстана накоплено более 30 млрд.

т химических веществ. Ежегодно производится 90 млн. т химических отходов, до 20 млн. м³ ТБО, до 1 млрд. т промышленных отходов. Следует отметить, что от общего объема отходов на Костанайскую область приходится 44 %, Карагандинскую – 20 %, Павлодарскую область – 18 %. От общего объема образованных отходов использовано, утилизировано и переработано 15,6 %. При разработке месторождений полезных ископаемых используются только 3–5 % объема добываемого сырья, остальное накапливается в виде отходов. Основная масса отходов горных предприятий складируется в хвостохранилищах, которые занимают огромные площади, нарушают природный ландшафт, загрязняют воздушный бассейн, поверхностные и подземные воды [75–76].

По отраслям промышленности наибольший объем промышленных отходов составляет по областям:

– Костанайской (горнодобывающая, ТЭЦ, ЖКХ) – 360,0 млн. т;

– Карагандинская (горнодобывающая, ТЭЦ, угледобывающая, цветная и черная металлургия) –231,0 млн. т.;

– Павлодарской (цветная, черная металлургия – 195,0 млн. т, Актюбинская (черная металлургия, химическая, нефтегазодобывающая, энергетика) – почти 45,0 млн. т.

Как видим, крупнотоннажными производственными отходами являются золошлаковые отходы ТЭЦ, состоящие из трех фракций – алюмосиликатной (75–85 %), железистой (5–7 %) и углеродной (1–2 %). Первая фракция золы-уноса представлена муллитом ($Al_2O_3 \cdot 2SiO_2$) и α-$SiO_2$ и примесью магнетита, кристаболита и гематита, содержание глинозема и кремнезема составляет соответственно 20-32 и 45–51 %; во второй фракции концентрируются «малые» элементы (черные, цветные, редкие и редкоземельные) и 70 % их сорбируются в железных сферолитах: цинк, ванадий, титан, германий, стронций и др. Предлагаемые биотехнологии по утилизации золошлаковых отходов направлены на использовании их в процессе биовыщелачивания редкоземельных и благородных металлов [73–77].

На рис.6.5 и 6.6 показаны блок-схемы утилизации золошлаковых отходов ТЭС.

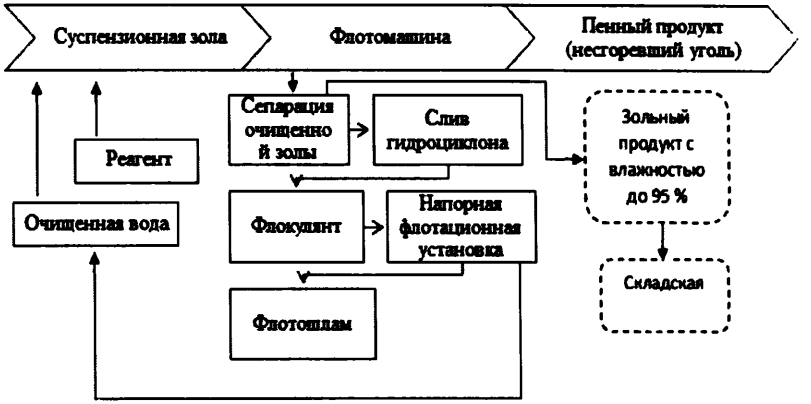



Рис. 6.5. Блок-схема предварительной флотационной обработки золошлаковых отвалов ТЭЦ

Как видим, на рис. 6.5 показан первый этап – предварительная флотационная обработка золошлаковых отвалов ТЭЦ для последующей биотехнологии переработки золошлаковых отходов ТЭЦ.

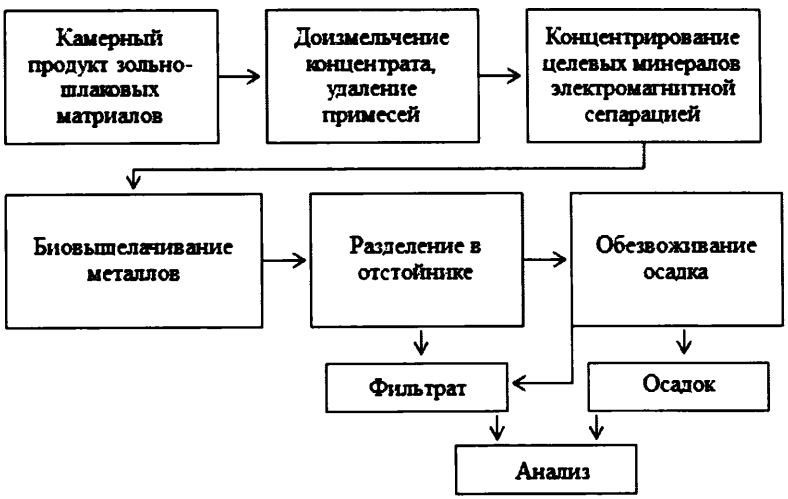



Рис. 6.6. Блок-схема биотехнологии извлечения благородных и редкоземельных металлов из зольно-шлаковых материалов

На первом этапе (подготовительном) этапе тонкодисперсная зола, полученная в процессе смешивания зольных отходов с водой и углеродсодержащим реагентом, подвергают флотационной обработке, в результате которого получают камерный продукт (очищенная зольная суспензия), который в свою очередь поступает на сепарацию, откуда слив гидроциклона подвергается обработке катионактивным флокулянтом и, далее – в напорную флотационную установку. Полученная таким способом очищенная зола используется в качестве сырья для биовыщелачивания из нее благородных и редкоземельных металлов.

Второй этап (биовыщелачивание, рис. 6.6) предполагает проведение вначале предферментации (подготовка и накопление биомассы хемолитотрофных бактерий на золошлаках в заданном объеме пульпы), затем основная ферментация (бактериальное выщелачивание металлов в каскаде биореактора) и далее, как это видно из рис. 6.6, осуществляют разделение пульпы и регенерацию растворов бактериального выщелачивания такими операциями, как осаждение, фильтрация, флотоактивация.

Представленная технология позволяет получить примерно по редкоземельным металлам: лантан – 62,8 %, скандий – 62,4 %, иттрий – 61,6 %; а по благородным: золото – до 80 %, серебро – до 81 %.

### *6.1.2. Биотехнология в гидроэнергетике*

Гидроэлектростанция (гидроэлектрическая станция, ГЭС) – это комплекс сложных гидротехнических сооружений и оборудования. Его назначение – преобразовывать энергию потока воды в электрическую энергию (рис. 6.7, 6.8).

Важнейшее гидротехническое сооружение – *плотина*, которая задерживает воду рек в водохранилище, создает необходимый напор воды.

Главный двигатель на ГЭС – *гидравлическая турбина*, с помощью которой энергия воды, движущейся под напором, превращается в механическую энергию вращения, которая затем (благодаря *электрическому генератору*) преобразуется в электрическую энергию.

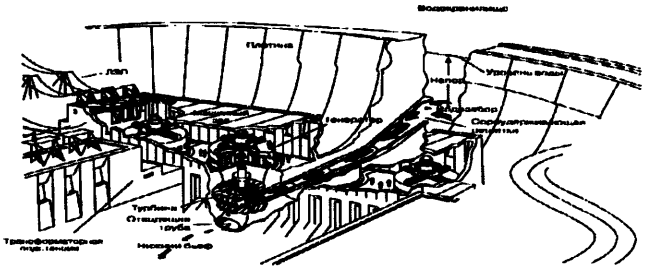


Рис. 6.7. Схема гидроэлектростанции

**ГИДРОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СТАНЦИИ (ГЭС)**

| Мощные; вырабатывают от 25 мВт и выше | Высоконапорные; более 60 м | Средние; до 25 мВт | Средненапорные; от 25 м | Малые гидроэлектростанции; до 25 мВт | Низконапорные; от 3 до 25 м |
|---|---|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Русловые и плотинные ГЭС**: напор воды создается плотиной, полностью перегораживающей реку; строят на многоводных равнинных и горных реках, в местах, где русло реки более узкое, сжатое | **Приплотинные ГЭС**: более высокий напор воды; река полностью перегораживается плотиной; здание ГЭС за плотиной, в нижней её части. Водаподводится к турбинам через напорные спецтоннели, а не непосредственно, как в русловых ГЭС | **Деривационныегидроэлектростанции**: на больших уклонах реки. Вода собирается посредствомдеривации и отводится из речного русла через спецводоотводы. Вода подводится непосредственно к зданию ГЭС | **Гидроаккумулирующие Электростанции** (ГАЭС) аккумулируют электроэнергию и пускают её в ход в моменты пиковых нагрузок; в определенные периоды (не пиковой нагрузки), агрегаты ГАЭС закачивают воду в спецоборудованные верхние бассейны При необходимости вода из них поступает в напорный трубопровод и приводит в действие турбины |

**Эмиссии предприятий ГЭС как объекты для применения биотехнологий:**
- производственные сточные воды (от вспомогательных – ремонтных цехов);
- промливневые сточные воды (с промышленной площадки ГЭС);
- хоз-бытовые сточные воды;
- отходы производства (от вспомогательных цехов);
- отходы потребления

Рис. 6.8. Классификация гидроэлектростанций

Гидравлическая турбина, гидрогенератор, устройства автоматического контроля (пульты) размещены в машинном зале здания ГЭС.

Повышающие трансформаторы могут располагаться и внутри здания, и на открытых площадках. Распределительные устройства чаще всего устанавливают на открытом воздухе рядом со зданием.

Гидроэлектростанции делятся в зависимости от мощности выработки энергии; от максимального использования напора воды; от принципа использования природных ресурсов, и, соответственно, образующейся концентрации воды.

По установленной мощности гидроэлектрические станции подразделяют на малые – до 5 МВт, средние – от 5 до 25 и крупные – свыше 25 МВт.

Для эффективного производства электроэнергии на ГЭС необходимы два основных фактора: гарантированная обеспеченность водой круглый год и возможно большие уклоны реки, благоприятствуют гидростроительству каньон образные виды рельефа.

На ГЭС могут быть применены биотехнологические методы для очистки хозяйственно-бытовых сточных вод. Общий принцип биотехнологии очистки хозяйственно-бытовых сточных вод принципиально не отличается от технологии, описанной выше в табл. 6.2.

### *6.1.3. Биотехнология в атомной энергетике*

Атомная электростанция (АЭС) – ядерная установка для производства энергии в заданных режимах и условиях применения, располагающаяся в пределах определённой проектом территории, на которой для осуществления этой цели используются ядерный реактор (реакторы) и комплекс необходимых систем, устройств, оборудования и сооружений с необходимым персоналом.

Атомные электростанции классифицируются в соответствии с типом используемых реакторов (рис. 6.9).

Устройство атомного реактора показано на рис. 6.10.




Рис. 6.9. Классификация атомных электростанций




Рис. 6.10. Устройство атомного реактора

На рис. 6.10 показано: *1 – ядерная реакция генерирует тепло; 2 – тепло передается воде; 3 – вода превращается в пар; 4 – пар вращает турбины; 5 – в генераторе энергия вращения турбин преобразуется в электроэнергию; 6 – охлажденная вода закачивается насосами обратно в реактор.*

Одной из экологических проблем АЭС являются низкорадиоактивные сточные воды, хоз-бытовые сточные воды (табл. 6.2) и отходы производства (рис. 6.9, 6.11), которые могут очищаться с помощью биотехнологических методов.

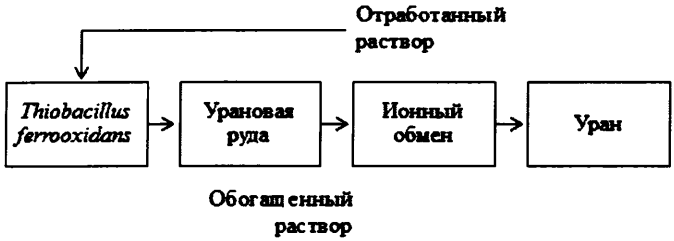



Рис. 6.11. Схема биовыщелачивания урановой руды

Как видно из рис. 6.11, при выщелачивании урансодержащих руд уран извлекается из выщелачивающего раствора.

При этом следует отметить, что уран извлекают подземным, кучным, чановым методами.

Уран в рудах присутствует, в основном, в четырехвалентном состоянии в виде таких минералов, как ураноторит, уранинит. Эти соединения урана не растворимы в серной кислоте, которую используют традиционно. В результате выщелачивания $U^{4+}$ должен быть окислен в $U^{6+}$, соединения которого растворимы в $H_2S0_4$.

Бактерии A. Ferrooxidans косвенно участвуют в растворении урана, обеспечивая образование окислителя $Fe^{-}$и его постоянную регенерацию. Процесс проводится как подземным, так и кучным способами.

Из растворов уран извлекается с помощью ионообменных смол.

В состав энергетических корпораций Казахстана, вырабатывающих электроэнергию на тепловых электростанциях, часто входят как основное производство, так и вспомогательная сырьевая база – электростанция и угледобывающее предприятие. В мировой практике в технологии добычи угля биотехнологические методы перспективны и изложены в гл. 7«Биотехнология в горнодобывающей промышленности».

## 6.2. Биотехнологии в альтернативной возобновляемой энергетике

Источниками альтернативной энергетики являются: биотопливо, биоэтанол, биогаз,биодизельнное топливо, бактериальная энергобиомасса из отходящих газов, диметилэфир и др.

Биотехнологическое промышленное производство обеспечивает выработку возобновляемой энергии из биотоплива.

Биотопливо – это альтернативное возобновляемое топливо, производимое из биологического (растительного, животного) или техногенного (органические отходы производства, твердые бытовые отходы) сырья (рис. 6.12).




Рис. 6.12. Концепция биопереработки [123]

Как видно из рис. 6.12, биотопливо основано на производстве энергетически обогащенной в процессе фотосинтеза биомассы (микроводоросли, многолетние травы, кустарники, древесина и др.) или в процессе микробиологической переработки отходов.

Производимая биомасса может использоваться в качестве топлива непосредственно или после соответствующей переработки.

Производство энергетически обогащенной биомассы основано на явлении фотосинтеза. Именно благодаря фотосинтезу солнечная энергия может быть запасена на миллионы лет (при образовании нефти, газа, угля, торфа). Запасенная через фотосинтез в биомассе солнечная энергия сама может служить потом источником энергии. Так, ежегодно растительность образует 100 млрд. т биомассы, 50 % из которых приходится на долю морей и океанов.

На сегодня имеются два основных метода получения топлива из биомассы – это биологическая или термохимическая конверсия.

Биологическая конверсия предполагает применение анаэробных микробиологических процессов в производстве возобновляемых источников энергии.

Перспективы использования биомассы в качестве энергии -- это производство тепловой энергии, электроэнергии и энергии для двигателей внутреннего сгорания.

Биотопливо в зависимости от физического состояния может быть:

– жидким (биоэтанол, биометанол, биодизель), используются для двигателей внутреннего сгорания;

– твердым (солома, щепа, дрова, топливные гранулы, брикеты), используются для получения тепловой энергии;

– газообразным (биогаз, биоводород, синтез-газ), используются для производства тепловой и электрической энергии.

Основные источники биомассы: органические отходы производства (отходы лесной и деревообрабатывающей промышленности, отходы целлюлозно-бумажной промышленности, биологические отходы в сельском хозяйстве) и потребления (твердые бытовые отходы), сточные воды, а также сельскохо-

зяйственные технические культуры (рапс и др.). Для почти половины населения мира, биомасса является основным энергоисточником.

Источники получения энергии с помощью биомассы:

1) непосредственное сжигание биомассы: дикорастущий лес заменяется «энергетическим лесом» (специальные плантации быстрорастущих видов деревьев – тополя, осины, ивы, ольхи);

2) брожение биомассы – в процессе брожения органических отходов (навоз, помет, опилки и т.п.) выделяется тепло, которую успешно используют в подсобных хозяйствах для обогрева, например, в теплицах;

3) использование таких энергоносителей, как биогаз или спирты, извлекаемые в процессе образования биомассы.

Промышленное производство жидкого топлива рассмотрим на примере биоэтанола. Так, способ получения спиртов исключает наличие канцерогенных полициклических углеводородов.

**Биоэтанол** (этиловый спирт) производится в огромном количестве путем каталитической гидратации этилена, причем каждые 740 кг этилена дают 1 т этанола. Биоэтанол получают также из гидролизатов отходов деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности методом брожения. Из 1 т сухой древесины образуется 170–200 л биоэтанола. Себестоимость биоэтанола наполовину ниже среднеотраслевого показателя.

В табл. 6.3 дана краткая характеристика промышленного производства биоэтанола.

Как видно из табл. 6.3, в основе производства этилового спирта лежит спиртовое брожение. Также следует обратить внимание, что при использовании продуцента *Saccharomyces cerevisiae* биоэтанол синтезируется через гликолиз, тогда как при использовании *Zymomonos mobilis* – через путь Энтнера-Дудорова.

На рис. 6.13 дана блок-схема промышленного производства биоэтанола.

Как видно из рис. 6.13, при дистилляции или сепарации получают 95 %-й биоэтанол, который пригоден в качестве топлива, а при использовании мембранной или молекулярной фильтрации – 100 %-й биоэтанол. Также следует отметить, что при повторном использовании биомассы в производственном цикле, время ферментации сокращается.

Таблица 6.3

Характеристика биотехнологического производства биоэтанола

| № п/п | Показатель | Характеристика |
|---|---|---|
| 1 | Химическая формула | $C_2H_6O$ |
| 2 | Продуценты | Дрожжи *Saccharoniyces cerevisiae* (гликолиз), *Zymomonos mobilis*(путь Энтнера-Дудорова), термофильные анаэробные бактерии *Thermoanaerobactere thanolicus* |
| 3 | Технология производства основана | На использовании сахарсодержащего и целлюлозосодержащего сырья. Анаэробное брожение осуществляется при температуре 29–32 °С, pH 4,2–5,2. При глюколизе 1 моль D-глюкозы образует 2 моль этанола. Или для термофильных бактерий – 69 °С, pH 4,5–9,5. Процесс брожения длится 48–72 часов |
| 4 | Применение биоэтанола | Топливо, а также как сырье для химической промышленности (производство синтетического каучука), как растворитель |

При содержании клеток в растворе 12–124 г/л концентрация этанола в зависимости от используемой культуры варьирует в пределах 41–160 г/л, при этом максимальный выход продукта составляет 29–120 г/л.

Во многих тропических странах сооружены заводы, где из растительных отходов извлекают биоэтанол, который используется в смеси с бензином в разных пропорциях. Добавляя его в бензин, можно экономить нефть и уменьшать токсичность выхлопных газов.

Смесь Е-10 включает 10 % биоэтанола (заправляют автомобиль; снижает выброс парников газов до 19 %), Е-85 – 85 % (требует реконструкции двигателя и системы питания). Автомобили Flex-Fuel (FFV) работают и на бензине, и на его смеси с биоэтанолом в любом соотношении.

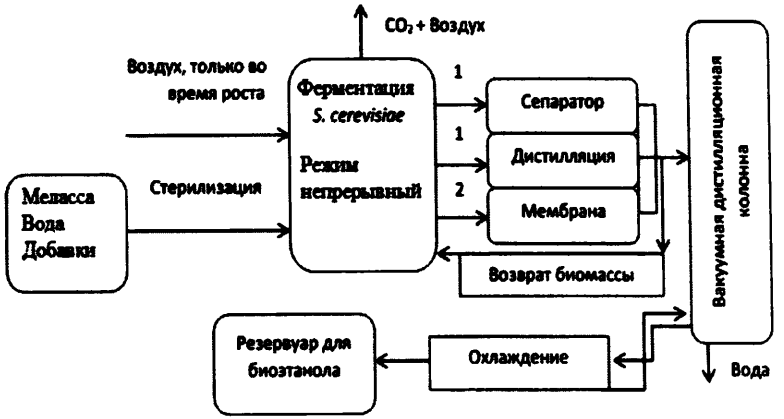



Рис. 6.13. Блок-схема производства биоэтанола из мелассы

Для биотехнологии представляет интерес технологии производства ***биодизельного топлива***.

На рис. 6.14 показана блок-схема, а в табл. 6.4 дается краткая характеристика биотехнологии производства биодизельного топлива.

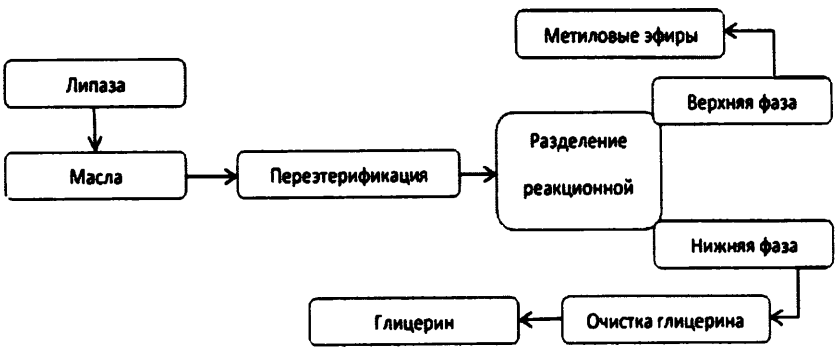



Рис. 6.14. Блок-схема биокатализа биодизельного топлива

Из табл. 6.4 и рис. 6.14 видно, что переэтерификация, катализируемая липазой, происходит по классической схеме. При этом следует отметить, что по сравнению с химическим методом получения биодизельного топлива, ферментативный метод

лишен проблем, связанных с присутствием в системе щелочных сточных вод, которые требуют обработки, т.к. свободные жирные кислоты и вода, с одной стороны, препятствуют осуществлению каталитического процесса, с другой, требуют более высокого потребления энергии.

Таблица 6.4

**Биотехнология производства биодизельного топлива (производные триглицеридов – метиловые или этиловые эфиры жирных кислот)**

| Показатель | Краткая характеристика |
|---|---|
| Производимый продукт | Биодизельное топливо: метиловые или этиловые эфиры жирных кислот (производное триглицеридов). Продукт, получаемый путем реакции переэтерификации с метанолом или этанолом, нетоксичен и подвергается биодеградации |
| Субстрат | Отходы нефти, масло, например, оливковое, костровое |
| Продуценты | *Rhizopus oryzae, Pseudomonas aeruginosa* |
| Подготовительный этап | Иммобилизованные продуценты обрабатываются раствором глутарового альдегида в фосфатном буфере (0,01–1,0%, pH 6,8) при 25 °С в течение 1 ч, либо на 30 мин подвергается преинкубации в метилолеате, затем на 12 ч – в соевом масле.Этап необходим для повышения содержания метилового эфира до 95–97 % от расчетного количества |
| Ферментативный процесс | Типовая схема:<br>а) триглицерид + спирт $\overset{\text{Катализатор}}{\Longleftrightarrow}$ эфиры жирных кислот + глицерин.<br>б) 1. Триглицерид (ТГ) + R'OH $\overset{\text{Катализатор}}{\Longleftrightarrow}$ Диглицирид (ДГ) + $R'COOR_1$<br>2. ДГ + R'OH $\overset{\text{Катализатор}}{\Longleftrightarrow}$ Моноглицирид (МГ) + $R'COOR_2$<br>3. МГ + R'OH $\overset{\text{Катализатор}}{\Longleftrightarrow}$ Глицирин + $R'COOR_3$<br>R' – остатки спиртов, $R_1$.$R_2$, $R_3$ – остатки жирных кислот. |

продолжение табл. 6.4

| Показатель | Краткая характеристика |
|---|---|
| Ферментативный процесс | Биокатализ методом иммобилизации на полиуретане или каолине: жиры нефти/масел преобразуются липазой в соответствующие эфиры (смесь метиловых и этиловых эфиров карбоновых кислот).<br>Метанолиз проводят в реакционной смеси, содержащей до 10 г соевого масла в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,8, в присутствии 1,5 мл метанола и катализатора в виде иммобилизованных клеток. Ингибиторами метанолиза неочищенного соевого масла служат фосфолипиды. Получаемые в этой реакции длинноцепочечные эфиры жирных кислот (незагрязнённые сажей и серой) используются как дизельное топливо.<br>*Особенность.* При использовании метанола и этанола необходимо присутствие в среде 1,4-диоксана. Если в качестве короткоцепочечных спиртов используется 1-пропанол или 1-бутанол, то реакция проходит без введения дополнительного органического растворителя |
| Преимущества биокатализа | Технологически более легкий процесс возвращения глицерина в среду реакции. Иммобилизованный фермент может использоваться многократно без заметной потери активности |

Преимущества ферментативного катализа обеспечиваются также более простым с технологической точки зрения процессом возвращения глицерина в среду реакции.

Биодизель так же, как и биоэтанол, применяется в автомобилях не в чистом виде, а в смеси с дизтопливом: В–20 – 20 % биодизеля, 80 % – обычного дизтоплива.

Применение в качестве добавки к основному топливу биоэтанола и биодизеля с одной стороны обеспечивает экономию выхлопу, с другой – снижает мощность двигателя и увеличивает расход топлива.

**Биогаз** в основном получают из сельскохозяйственных (растительных, животных) и коммунальных (твердые бытовые

отходы, канализационные сточные воды) отходов. Хотя он и не является высококачественным энергоносителем, но и с успехом может быть использован для производства тепловой и электрической энергии.

Пути производства энергии из ТБО от промышленных объектов – это мусоросжигающие заводы и полигоны ТБО. В таких городах, как Париж, Лондон, Барселона, Монако, Брюссель, Москва, Канны и другие, много лет работают заводы по превращению ТБО в электрическую и тепловую энергию. Всего мусоросжигающих заводов по всему миру насчитывается более двухсот.

Другой путь производства возобновляемой энергии из ТБО – это полигоны ТБО, где в процессе метаногенеза свалочных тел образуется биогаз, включающий почти 50–70 % метана. В процессе сбора биогаза на полигонах ТБО можно производить энергию для нужд урбанизированных территорий.

Общепринятая технологическая схема эксплуатации полигона ТБО представлена на рис. 6.15.




Рис. 6.15. Основные технологические операции при эксплуатации полигонов ТБО [73]

Как видно из рис. 6.15, в результате поддержания определенной технологии на полигонах ТБО для свалочного тела характерно:

1. Вследствие непрерывного наслаивания отходов свалочное тело имеет сложный характер разложения в результате функционирования смешанной микрофлоры (разные стадии биодеградации).

2. Из разлагающихся твердых отходов образуются продукты двух типов: фильтрующиеся в почву воды (ФВ) и газы (биогазы).

3. Свалочный биогаз состоит из метана (до 60–70 %), углекислоты (до 40 %) и микропримесей (сероводород, углеводороды, ртуть и др.).

4. На процесс разложения отходов влияют физические (температура, плотность и др.), химические (молекулярные свойства отходов, такие как водорастворимость, коэффициент распределения вода/липиды, летучесть, размер молекул, pH и пр.) и биологические (межвидовое взаимодействие, перекрывание экологических ниш и ареалов различных видов микроорганизмов) факторы. Следует отметить, что ферментативные процессы на геотехногенном уровне (свалочное тело, как геобиореактор) протекают поэтапно.

Фазы распада органической составляющей ТБО в техногенно созданных геобиореакторах кратко охарактеризованы в табл. 6.5.

Из табл. 6.5 видно, что процесс биоразложения ТБО протекает в три этапа: гидролиз, ацетогенез и метаногенез.

Физико-химические условия разложения в этих фазах:

– *при гидролизе* происходит выделение тепла, температура достигает 60°С;

– *при ацетогенезе* – pH = 5–6, t = 25 °С, повышаются БПК и ХПК; соотношение БПК/ХПК составляет 0,7;

– *при метаногенезе* pH = 7,2–8,6, уменьшаются ХПК и $БПК_5$.

Как видно из табл. 6.5, в процессе твердофазной ферментации в условиях геобиореактора образуется возобновляемый источник энергии – биогаз.

Таблица 6.5

**Фазы распада органической составляющей ТБО в техногенно созданных геобиореакторах**

| Показатель | Фазы распада органической составляющей ТБО | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Гидролиз | Ацетогенез | Метаногенез | Затухание метаногенеза |
| Продолжительность, лет | до 2-х | 2–5 | 4–50 | 50–1000 |
| Глубина протекания фаз распада, м | до 1-го | 1–8 | 5–15 | более 15 |
| Биохимические процессы фаз распада | Биодеструкция легкоразлагаемых фракций | Деструкция, гидролиз древесины, целлюлозы | Целлюлоза разлагается до 50–70 % | Через нарушенную поверхность в свалочное тело проникает $O_2$ |
| Микробиологическая активность фаз распада | Сульфатредуцирующие, денитрификаторы, гибель патогенных | Ацетогенные (гидролитические) | Хемолитотрофные и ацетофильные метаногенные | Рост аэробов |
| Продукты по фазам распада | Жирные кислоты, аминокислоты, глицерин, полисахара, аммиак. Растворение металлов и переход их в фильтрат | Уксусная и пропионовая кислоты, $CO_2$ и $H_2O$. Высвобождаются тяжелые металлы | Фаза образования биогаза. Эмиссия фильтрата | ТМ и токсичные органические соединения (фенол, хлорорганические вещества) переходят в фильтрат |

В мире ежедневно образуется 1,3 млрд. т ТБО, в Казахстане ежегодно образуется до 4 млн. т ТБО. Полуторамиллионный Алматы ежегодно производит более 600 тыс. т/год ТБО. Переработкой отходов сейчас занимается около 30 различных компаний, но при этом доля переработки вторсырья не превышает 3 %.ТБО вывозятся из города десятью государственными и почти четырьмя десятками частных фирм на так называемый полигон, расположенный в Карасайском районе Алматинской области. Но подобный метод утилизации ТБО бесперспективен, во-первых, занимаемая под свалку территория уже составляет 65 гектаров. Расчеты показывают, если принимать технологию сжигания ТБО на специализированном заводе, то такой мегаполис, как Алматы, может на треть быть обеспечен электроэнергией.

Применяемая ранее шведская технология компании «BAIA-press» по складированию и захоронению твердых бытовых позволяет уменьшить объем ТБО в 4–6 раз, при этом габариты складируемых отходов уменьшаются в 8–14 раз. Но из-за неэффективности вследствие лишь уменьшения объема, но не полного уничтожения. Альтернативой этой технологии может стать либо введение в эксплуатацию мусоросжигательного завода, либо – путем ввода на полигон инженерных решений по сбору и переработке биогаза.

Термохимическая утилизация ТБО – процесс наиболее рентабельный, экономичный. Мусоросжигательный завод работает по принципу ТЭЦ, где твердые бытовые и коммерческие отходы являются топливом. Подсчитано, что теплота сгорания трех тонн ТБО равняется теплоте от сжигания одной тонны угля. При этом вырабатывается электрическая и тепловая энергия, которой могут пользоваться промышленные предприятия и население города. Например, во Франции из 8,5 млн. т сжигаемых ежегодно бытовых отходов 80 % перерабатываются в энергию.

Подсчитано, что в целом в Казахстане годовой выход животноводческих и птицеводческих отходов по сухому весу – 22,1 млн. т, это 8,6 млрд. $м^3$ биогаза. Растительных отходов в год у нас накапливается 17,7 млн. т, что эквивалентно 14–15 млн. т условного топлива, или 12,4 млн. т мазута. Это более половины объема добываемой нефти [75–77].

Переработка этого биогаза в электрогазогенераторах позволит получать ежегодно до 35 млрд. кВт/ч и одновременно 44 млн. Гкал тепловой энергии. Кроме того, если использовать биогаз для производства электроэнергии, себестоимость ее оказывается всего 0,025–0,075 долл. за кВт/ч, в то время как электроэнергия от традиционных источников обходится в 0,1–0,15 долл. за кВт/ч. Биометан рассматривается также как перспективное моторное топливо.

**Биоводород, как энергоноситель**

Водородные топливные элементы по сравнению с двигателями внутреннего сгорания повышают энергетическую эффективность (рис. 6.16) [99].

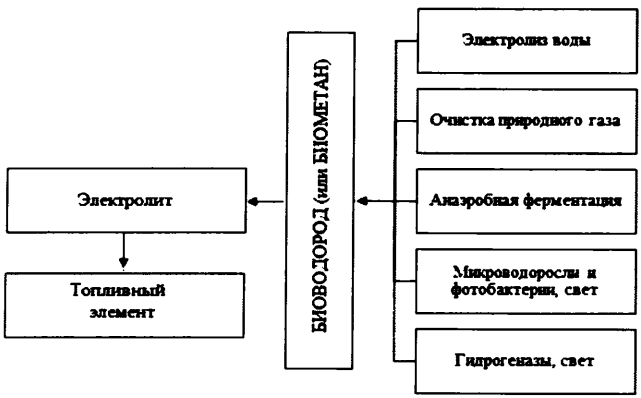



Рис. 6.16. Блок-схема биоводородных технологий

Как видно из рис. 6.16, биоводород производят:

– в процессе биофотолиза воды микроводорослями и цианобактериями;

– при фоторазложении органических веществ и биомассы фотосинтезирующими микроорганизмами;

– при бактериальной ферментации биомассы.

**Бактериальная энергобиомасса**

Для решения проблем в энергетике и промышленности производят микробную биомассу бактериального происхождения (табл. 6.6).

Таблица 6.6

**Показатели производства микробной биомассы бактериального происхождения для проблем энергетики и промышленности**

| № п/п | Показатель | Водородные | Метаноокисляющие |
|---|---|---|---|
| | | *Hydrogenomonas* | *Mycobacterium, Pseudobacterium, Chromobacterium, Brevibacterium* |
| 1 | Область применения | В энергетике и промышленности | В энергетике и промышленности |
| 2 | Питательная среда | Сырьем для получения биомассы служат газы (углекислый газ – 10 %, водород – 75 % и кислород – 15 %) и смесь минеральных солей | Усваивают метан автотрофно с образованием $CO_2$ из $CH_4$ и гетеротрофно при последовательном окислении $CH_4$ через спирт и альдегид |
| | | Газ непрерывно пропускается через культуральную жидкость – раствор солей, в котором суспендирована культура клеток | |
| 3 | Ферментация | При периодическом перемешивании среды и продувании ее газовой смесью. На 1 л культуральной жидкости приходится 3–5 г биомассы посевного материала. Условия культивирования: pH – 6,8 t = 31–32 °C | Замкнутая система циркуляции газовой смеси (кислород – 8–10 %, метан – 10–15 %, $CO_2$ – 5 % и остальное - азот) по периодической системе культивирования. Условия культивирования: t 30 °C, давление 4 МПа в начале и 0,1 МПа в конце ферментации |
| 4 | Выход биомассы | 50 г/л культуральной среды, что соответствует 4,5 кг/ч биомассы на 1 $м^3$ емкости | На получение 1 т сухой бактериальной биомассы расходуется 1,25–1,3 т метана |

Как видно из табл. 6.6, при производстве метаноокисляющих и водородных бактерий применяют периодическую ферментацию с обязательным продуванием среды газовой смесью.

**Диметилэфир(ДМЭ)**

ДМЭ – это безсерный газ, перешедший при давлении в 5 бар в жидкое состояние. Показатели ДМЭ схожи с характеристиками сжиженного нефтяного газа, но его теплосодержание и теплотворная способность ниже. В промышленности ДМЭ производят из природного газа, угля или биомассы. Применяют ДМЭ в качестве топлива для грузовых автомобилей.

На рис. 6.17 показана блок схема производства диметилэфира.

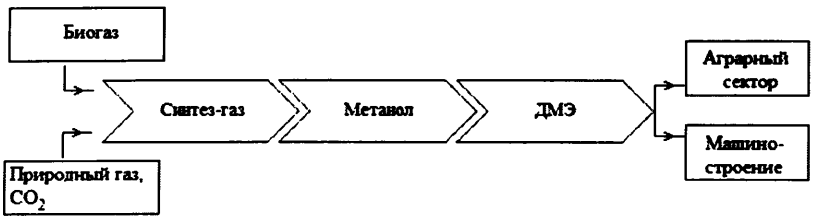



Рис. 6.17. Блок-схема производства ДМЭ

Как видно из схемы, представленной на рис. 6.17, при производстве ДМЭ, можно получать синтез-газ и метанол. Все три продукта успешно применяются как топливо для двигателей внутреннего сгорания.

STG + технология в виде блок-схемы показана на рис. 6.18.

Как видно из рис. 6.18, процесс STG+ основан на технологии MTG и базируется на непрерывном цикловом термохимическом процессе для преобразования природного газа или синтез-газа в высокооктановый синтетический бензин. Весь цикл протекает последовательно в четырех реакторах:

1) синтез метанола;

2) дегидратация метанола в синтез ДМЭ;

3) ДМЭ с помощью катализаторов преобразуется в углеводороды, включающие парафины (алканы), ароматические углеводороды, нафтены (циклоалканы) и небольшое количество олефинов (алкенов);

4) очистка бензина путем трансалкировании и гидрогенизации.

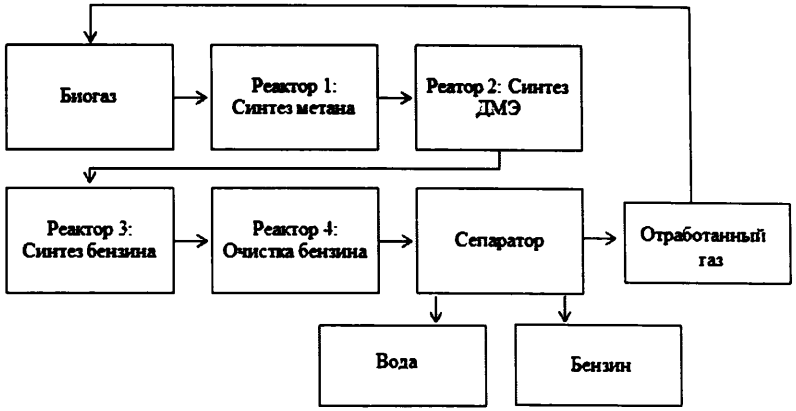



Рис. 6.18. Блок-схема технологии STG+

Технология обеспечивает переход биогазообразного топлива в биожидкое путем получения биотоплива через синтез-газ, где используются три основных процесса: Фишера-Тропша, MTG (Methanol to gasoline) компании Mobil и STG+ (Syngas to gasoline plus).

В первом процессе реакция начинается с частичного окисления биометана в диоксид углерода, монооксид углерода, водород и воду. Кислород поставляется из воздуха. Реакция с водяным газом регулирует соотношение CO и $H_2$ (1:2), а избыток $CO_2$ физическим растворением. Образованный таким образом синтез-газ, химически реагируя в присутствии катализатора (железо, кобальт), превращается в жидкие углеводороды.

Во втором процессе технология конверсии биогаза или природного газа в синтез-газе, а синтез-газа в метанол, после чего метанол полимеризуется в присутствии цеолитного катализатора с образованием алканов (насыщенных углеводородов).

Таким путем получают синтетический бензин, который имеет высокое октановое число и необходимые вязкостные свойства. Далее смесь поступает в сепаратор для конденсации. Несконденсированный газ и готовый бензин разделяются. Первый продукт направляется для переработки обратно в первый реактор, второй продукт – синтетический бензин состоит из парафинов, ароматических углеводородов и нафтенов [75–77].

Изучаются и необычные источники растительного топлива, например, пресноводная одноклеточная водоросль ботриококк, которые выращивают в фитобиореакторах (фитобиотехнология). Она на 85 % состоит из жира, при переработке которого можно получать бензин, авиационное и дизельное топливо и некоторое количество тяжелых масел.

Контрольные вопросы

1. Дать общее представление об энергетическом секторе экономики. Раскройте классфикационные особенности ТЭС, ГЭС и АЭС.

2. Возобновляемая альтернативная энергетика: альтернативное возобновляемое топливо, производимое из биологического (растительного, животного) или техногенного (органические отходы производства) сырья.

3. Дайте технологическую характеристику источникам альтернативной энергетики: биотопливо, биоэтанол, биогаз, биодизельнное топливо, бактериальная энергобиомасса из отходящих газов, диметилэфир, биоводород и др.

# 7. БИОТЕХНОЛОГИЯ В ГОРНОДОБЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

В горнодобывающей промышленности биотехнологические методы перспективны для рационального использования угольных ресурсов:

– для удаления метана метаноокисляющими бактериями из угольных пластов;

– для улучшения качества углей.

На практике для борьбы с метаном, проникающим через трещины в хрупких угольных пластах, который скапливается в шахте и может доходить до взрывоопасного количества, применяют орошение пласта глинистой пульпой. Однако риск возможных аварийных ситуаций остается высоким.

Для повышения безопасности в процессе добычи угля шахтным способом, а также для улучшения качества добываемых (открытым и подземным способами) углей удалением серы разработаны биотехнологические методы.

## 7.1. Биотехнология удаления метана из угольных пластов

В пластах каменного угля содержится огромное количество метана, достигающее сотни кубометров в 1 т угля. При этом, чем глубже залегает уголь в недрах земли, тем больше метана он содержит (рис. 7.1).

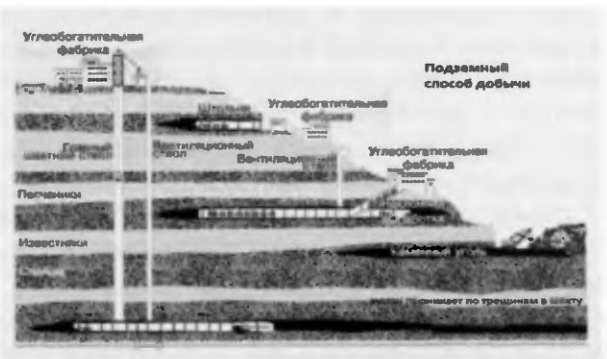



Рис. 7.1. Способы добычи угля

Традиционные средства борьбы с метаном в угольных шахтах (вентиляция, вакуумная дегазация, увлажнение пластов водой) в условиях постоянной интенсификации горных работ и перехода на все более глубокие угленосные горизонты часто уже не могут обеспечить одновременно высокий уровень угледобычи и безопасные условия труда.

На рис. 7.2 дана блок-схема, а в табл. 7.1 раскрывается краткая характеристика биотехнологии удаления метана из угольных пластов.

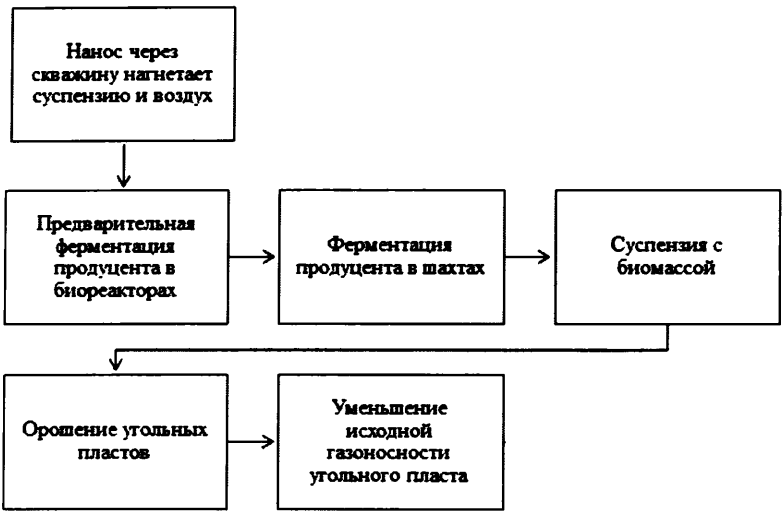



Рис. 7.2. Блок-схема биотехнологии удаления метана из угольных пластов

Как видно из рис. 7.2 и табл. 7.1, биотехнологический способ борьбы с метаном основан на использовании метанокисляющих микроорганизмов.

Процесс поглощения метана в угольных пластах метанокисляющими бактериями представляет собой единственную возможность разрушения молекулы метана при температурах разрабатываемых угленосных толщ. Следует отметить, что в угольных пластах и прилегающих породах метанокисляющие бактерии отсутствуют. Поэтому биомассу метанокисляющих

микроорганизмов подают со средой, а для течения ферментативных окислительных процессов – дополнительно воздух (блок-схема рис. 7.2).

Таблица 7.1

Биотехнология удаления метана из угольных пластов

| Показатель | Краткая характеристика |
|---|---|
| Продуценты | Метанокисляющие бактерии |
| Предварительная ферментация продуцента | Культивируют в ферментерах и в виде суспензии в питательной среде для наращивания биомассы |
| Основная ферментация | Рабочая суспензия готовится непосредственно в шахте. В рудничную воду, обогащенную минеральными солями (N, P), включают заданное количество биомассы. |
| Основная ферментация | В угольный пласт рабочая суспензия нагнетается насосами через скважины, пробуренные по углю пластов или из подземных выработок, или с поверхности земли: 1 т угля может принять 20–40 л рабочей суспензии. В угле микроорганизмы распределяются по трещинам и порам.<br>Для ферментативных процессов необходим свободный кислород, которого нет в угольных пластах. Поэтому в насыщенный метанокисляющими бактериями участок угольного пласта через те же скважины компрессором постоянно прокачивается воздух |
| Технологический эффект | В таких условиях бактерии потребляют содержащийся в угле метан, и за счет этого происходит уменьшение исходной газоносности угольного пласта |

Благодаря биотехнологии, поступление метана, как из угольных пластов, так и из выработанных пространств снижается примерно в 2 раза. При прочих равных условиях внедряемая биотехнология позволяет повышать добычу угля примерно в 1,5 раза.

Использование метанокисляющих бактерий для борьбы с метаном в угольных шахтах предложено в 1939 г. советскими учеными А. З. Юровским, Г. П. Капилаш и Б. В. Мангуби пред-

ложили применять эти бактерии для снижения выделения метана из выработанных пространств. Несмотря на широкое распространение метанокисляющих бактерий в природе, в угольных пластах и прилегающих породах они отсутствуют. Поэтому необходимое количество активных метанокисляющих бактерий выращивают в ферментерах и в виде суспензии в питательной среде подают в поровый объем угольных пластов и выработанные пространства.

### 7.2. Биотехнология в обессеривании (биодесульфуризация) углей для улучшения их качества

Бурые и каменные угли нередко содержат значительные количества серы (может достигать 10–12 %), а это снижает их качество: такие угли плохо коксуются и поэтому не могут быть использованы в цветной металлургии.

Коксование – процесс переработки твёрдого топлива (чаще угля) нагреванием при 1000 °С, без доступа кислорода. При разложении топлива образуются твёрдый продукт – кокс и летучие продукты. Коксуют также тяжелые нефтяные остатки. Полукоксованию подвергают бурые угли, горючие сланцы при 500–600 °С. Качественные показатели кокса зависят от содержания золы и серы в нем.

При энергетическом использовании углей с повышенным содержанием серы происходит перерасход топлива, а при коксовании – ухудшение качества кокса и увеличение его количества при выплавке чугуна. Так, увеличение сернистости угля на 0,1 % приводит к снижению производительности доменной печи и росту расхода кокса на 1,8 %. Превышение содержания общей серы в углях, предназначенных для коксования, на 0,1 % по сравнению со средними расчетными нормами влечет за собой снижение оптовой цены угля на 0,5 %.

Кроме того, при сжигании таких углей в атмосферный воздух выделяется большое количество оксидов серы, азота, углерода, являющихся причиной кислотных дождей, парникового эффекта.

Сера в углях присутствует как в виде пирита, так и в виде сложных ароматических соединений.

Для обессеривания углей применяют различные методы:

– физические: разделение на фракции, отличающиеся по плотности, магнитным, электростатическим, флотационным свойствам;

– химические;

– бактериальное выщелачивание;

– сочетание этих методов.

Физические методы обеспечивают снижение содержания серы на 10–60 % в концентратах преимущественно за счёт удаления пиритной серы.

Химические методы, основанные на действии окислительных и реже восстановительных агентов, приводят к переводу серы в газообразные или растворимые в водных средах продукты. Под действием водных растворов окислителей (например, азотная кислота) из угля извлекается практически всё количество неорганических и свыше 70 % органических соединений серы.

Перспективно использование раствора сульфата железа, что позволяет организовать замкнутый, практически безреагентный процесс обессеривания углей.

Для углей некоторых месторождений заметная степень обессеривания углей достигается при бактериологическом выщелачивании сероокисляющими хемоавтотрофными микроорганизмами (до 90 % пиритной серы).

Известна биогеотехнология обессеривания углей использованием тионовых бактерий для удаления серосодержащих соединений из углей. Общее содержание серы в углях может достигать 10–12 %.

Первые опыты по направленному удалению серы из угля с использованием микроорганизмов были выполнены в 1959 г. З. М. Зарубиной, Н. Н. Ляликовой и Е. И. Шмук. За 30 сут. с помощью бактерий Th. ferrooxidans из угля было удалено 23–30 % серы. Позже американскими исследователями было предложено микробиологическое обессеривание угля с помощью тионовых бактерий, что позволило снизить содержание пиритной серы в каменном угле за четверо суток почти на 50 %. При этом могут попутно выщелачиваться металлы. Известно, что в углях содержится германий, никель, бериллий, ванадий, золото, медь, кадмий, свинец, цинк, марганец.

Попутное получение ценных металлов при десульфуризации угля должно дать дополнительный экономический эффект.

По последним сообщениям в лабораторных условиях удается снизить содержание серы в угле путем микробиологического выщелачивания за 5 сут. почти на 100 %. Десульфуризация углей микробиологическим способом является весьма перспективной.

На рис. 7.3 дана блок-схема биотехнологии обессеривания углей.

В табл. 7.2 дана краткая характеристика биотехнологии обессеривания углей.




Рис. 7.3. Блок-схема биотехнологии обессеривания углей и биовыщелачивания ценных металлов

Как видно из блок-схемы рис. 7.3 и табл. 7.2, биогеотехнология обессеривания углей (биодесульфуризация) основана на способности тионовых бактерий окислять серосодержащие соединения углей, а попутное получение ценных металлов (германий, никель, бериллий, ванадий, золото, медь, кадмий, свинец, цинк, марганец) при десульфуризации угля дает дополнительный экономический эффект. В свою очередь ферментативное удаление серы из углей также экономически выгодно, так как с ним связывают надежды на решение проблемы сернокислотных дождей.

Таблица 7.2

Биодесульфуризация углей

| Показатель | Характеристика |
|---|---|
| Продуценты | Тионовые бактерии *Th. ferrooxidans.*Из тонкоизмельченного угля серу удаляют путем окисления бактериями *A.ferrooxidans.* |
| Технологический принцип | Удаление серы из углей. Технология сопровождаться Микробное удаление попутным выщелачиванием различных металлов |
| Продукты метаболизма | Благодаря ферментативным процессам из угля может быть удалено до 100 % пиритной серы за 5 суток<br>Попутное получение ценных металлов при десульфуризации угля: германий, никель, берилий, ванадий, золото, медь, кадмий, свинец, цинк, марганец |

Контрольные вопросы:

1. Способы добычи угля.
2. Традиционные средства борьбы с метаном в угольных шахтах (вентиляция, вакуумная дегазация, увлажнение пластов водой).
3. Методы обессеривания углей: физические, химические, бактериальное выщелачивание; комбинированные.
4. Биотехнология в обессеривании (десульфуризации) углей для улучшения их качества.
5. Биотехнология рационального использования угольных ресурсов.

# 8. БИОТЕХНОЛОГИЯ В ГОРНО-МЕТАЛЛУРГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

## 8.1. Общие понятия

Биотехнология нашла широкое применение в металлургической промышленности, основные процессы которой представляют *биовыщелачивание*, *биоокисление*, *биосорбцию*, *биоосаждение* металлов из концентратов, растворов и сточных вод для извлечения меди, золота, урана, редких и рассеянных металлов и др.

Процессы биотехнологического извлечения могут осуществляться:

– в специальном оборудовании;

– на природных *«территориях и емкостях»*;

– на техногенных *«территориях»*.

На рис. 8. 1 показаны варианты биотехнологического извлечения.

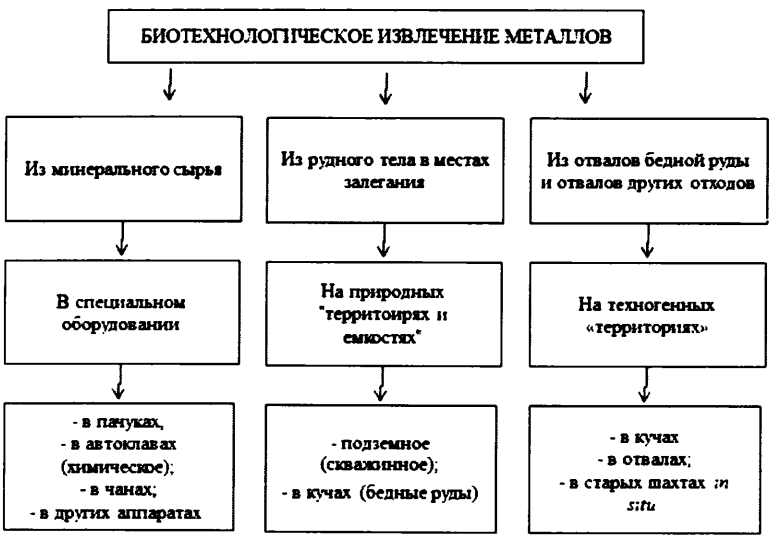



Рис. 8.1. Варианты биотехнологического извлечения металлов

*Пачук* – реактор, бак емкостью до 2000 м$^3$, в котором содержимое (пульпа) перемешивается воздухом из аэролифтной трубы в баке. Аэролифтная труба может быть полностью погружена в пульпу, либо верхним концом выходить из нее. Пульпу загружают через верхний люк, а выгружают с помощью дополнительного аэролифта сверху или снизу. Впервые пачук использован для выщелачивания серебросодержащих руд в металлургическом центре Мексики Пачука (Штат Индиана), от которого получил название. Пачук разных конструкций используют для выщелачивания U-, Au-содержащих и других руд, а также для сорбции из пульпы сорбционного выщелачивания.

*Автоклав* – для проведения различных процессов при нагреве и под давлением выше атмосферного. В этих условиях достигается ускорение реакции и увеличение выхода продукта. При использовании в химии или для проведения химических реакций используют название *«химический реактор»*. При использовании в медицине для стерилизации при высоком давлении и температуре – только автоклав. В случае, если стерилизация проводится при высокой температуре, но без давления, используют термин *«стерилизатор»* или *«сушильный шкаф»*. Был изобретён Дени Папеном в 1679 году.

*Чан* – бак, обычно снабжен мешалкой.

Наука, направленная на извлечение металлов из руд, концентратов, горных пород и растворов с помощью микроорганизмов и их метаболитов называется *биогеотехнологией*.

*Преимущества биогеотехнологии*:

– высокая экономическая эффективность за счет высокой экологичности;

– снижение капитальных затрат;

– уменьшение эксплуатационных расходов.

Термин *«бактериальное выщелачивание»* используется для описания процессов:

– растворения металлов из горных пород;

– растворения металлов из минеральных концентратов, получаемых на обогатительных фабриках;

– экстракции металлов из минералов, находящихся в горных породах;

– экстракции металлов из минеральных концентратов, получаемых на обогатительных фабриках.

*Недостатки*: требуются затраты на геоэкологические мониторинговые исследования.

В большинстве случаев основным источником металлов являются рудные тела, в которых металлы находятся в основном в виде сульфидных минералов, которые преобразуются по схеме:

*«сульфиды Ме → сульфаты Ме»*.

Экстракция этих металлов из сульфидных минералов осуществляется за счет окисления в водной среде сульфидов до растворимых сульфатов, переходящих в раствор, из которого эти металлы могут быть легко извлечены.

Ниже перечислены наиболее важные минералы, являющиеся природным источником металлов, извлекаемых бактериальным выщелачиванием.

## 8.2. Продуценты-микроорганизмы, используемые в биотехнологии извлечения металлов и технологические параметры процесса

**Продуценты-микроорганизмы, используемые в биогеотехнологиях**

В практике добычи металлов *«рабочими лошадками»* (рис. 8.2) вправе считать:

1) типичные гетеротрофные бактерии родов Bacillus, Pseudomonas, Arthrobacter и др.;

2) тионовые бактерии, представленные родом Thiobacillus – используют процесс окисления серы для получения клеточной энергии.

Тионовые бактерии:

– Железобактерии: *Leptospirillum ferrooxidans*, *Ferroplasma acidiphilum* и Thiobacillus ferrooxidans принадлежат к облигатным хемолитоавтотрофам, использующим энергию окисления железа для ассимиляции $CO_2$, окисляют $Fe^{2-}$, $S^{2-}$, $S^0$ и сульфидные минералы;

– Серобактерии: *Acidithiobacillus caldus* – умеренно термофильная сероокисляющая бактерия, активно развивающаяся при температурах 40–50 °С, не способная окислять железо (II),

*Sulfobacillus acidophilus* – хемолитотрофная грамположительная палочкообразная умеренно термофильная бактерия, растущая автотрофно и миксотрофно на двухвалентном железе, элементной сере в присутствии экстракта дрожжей и гетеротрофно на экстракте дрожжей.

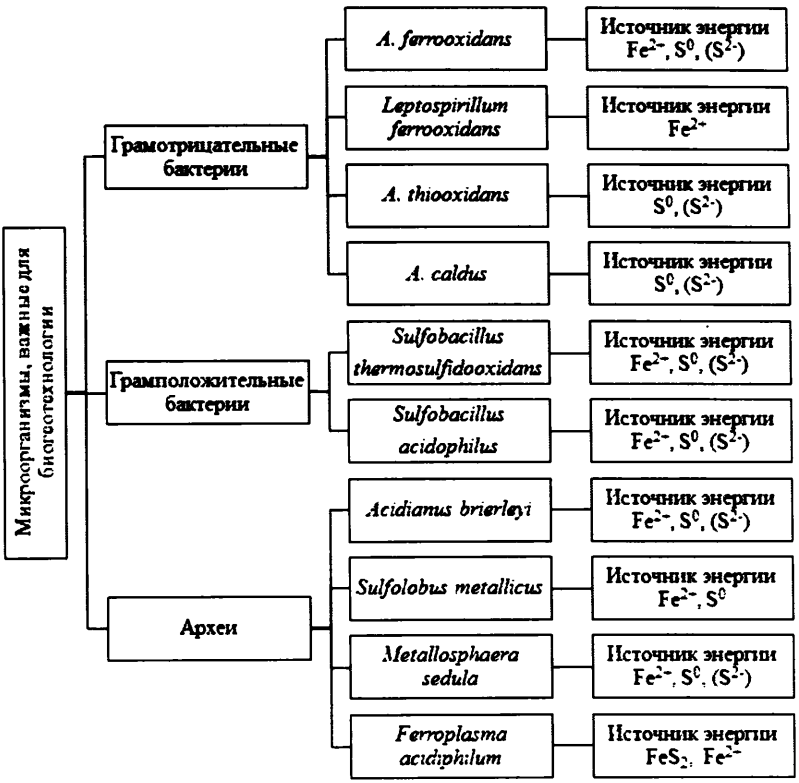



Рис. 8.2.Микроорганизмы, важные для биогеотехнологии

3) представители родов *Sulfolobus*, *Acidianus* и *Metallosphaera* – эффективнее окисляют сульфидные минералы при высоких температурах.

*Мицелиальные грибы и дрожжи.* В промышленности выщелачивания силикатных никелевых руд микроорганизмами использованы гетеротрофы класса грибы Aspergillus niger и Penicillinum. При-

менение автотрофных бактерий для выщелачивания силикатов определяются действием участвующей в процессе серной кислоты или присутствием в руде никеля в сульфидах.

**Технологические параметры процесса.** Основными физико-химическими факторами выщелачивания металлов являются:

– pH (пределы 1–5,5);

– Eh (пределы 0,5–0,7мВ);

– температура (2–40; 80°С);

– наличие кислорода, ионов сернокислого оксидного железа ($Fe^{+}$) и т. д.

Они в той или иной степени определяются типом руды, степенью ее окисления и проницаемостью, характером складирования, габаритами отвалов, способом подготовки руды или рудного тела к выщелачиванию на месте залегания и т. д.

Бактериальное окисление субстратов [23] протекает в следующей последовательности (рис. 8.3).

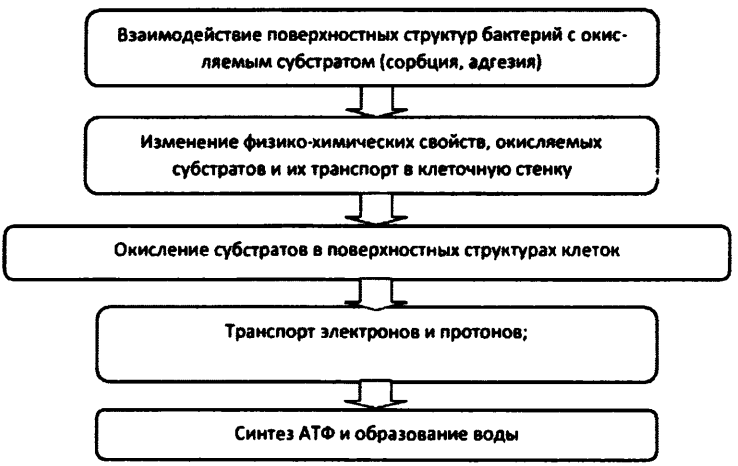



Рис. 8.3. Последовательность бактериального окисления субстратов

Технологические параметры в той или иной степени определяются типом руды, степенью ее окисления и проницаемостью, характером складирования, габаритами отвалов, способом подготовки руды или рудного тела к выщелачиванию на месте залегания и т. д.

Следует отметить, что бактериально-химические процессы едины и создают низкую величину pH, высокий окислительно-восстановительный потенциал среды, необходимую концентрацию $Fe^{+}$ и обеспечивают активные процессы выщелачивания металлов из руд.

### 8.3. Бактериальное выщелачивание металлов из минерального сырья

В состав большинства руд входят основные минералы – сульфиды металлов [75, 76]:

– в железных рудах сера и железо – $FeS_2$ в виде пирита и марказита, $FeS_{1+x}$ в виде пирротита;

– в медных рудах – $CuFeS_2$ (халькопирит), $Cu_2S$ (халькоцит), CuFeS (борнит), CuS (ковеллит);

– в цинковых рудах – ZnS (сфалерит) – основной источник цинка, часто совместно с сульфидом свинца. Руды сульфида цинка также являются важным источником кадмия;

– в никелевых рудах – NiS (миллерит), FeNiS (пентландит) – основные источники никеля, часто совместно с сульфидными минералами меди;

– в кобальтовых рудах – $CuCo_2S_4$ + (карролит) – добывают совместно с сульфидными минералами меди;

– в молибденовых рудах – $MoS_2$ (молибденит) – основной источник молибдена, совместно с сульфидными минералами меди;

– в свинцовых рудах – PbS (галенит) – основной источник свинца, часто совместно с сульфидом цинка, также важный источник серебра;

– в серебряных рудах – $Ag_2S$ (аргентит) – основной серебросодержаший минерал, всегда находится совместно с сульфидными минералами других металлов;

– в мышьяковистых рудах – AsFeS (арсенопирит) – источник мышьяка, часто встречается как сопутствующий минерал во многих сульфидных рудных телах.

Среда природного бактериального выщелачивания сульфидных минералов должна быть кислой, причем наиболее подходящим растворителем является серная кислота. Этот процесс поддерживается благодаря присутствию различных количеств

сильного окислителя – ионов железа (Ш). Также во всех реакциях, вызванных бактериями, присутствуют биохимические продукты микробного синтеза. Эти соединения могут либо непосредственно влиять на кинетику окисления сульфидных минералов, либо служить источником питательных веществ для гетеротрофных микроорганизмов, которые поддерживают соответствующие условия окружающей среды для роста автотрофных микроорганизмов, участвующих в выщелачивании минералов.

Таким образом, процесс бактериального выщелачивания зависит от образования серной кислоты и ионов железа (III), которое происходит в результате бактериального окисления из восстановленных соединений серы и ионов железа (II) соответственно.

Известно множество мезофильных, умеренно и крайне термофильных микроорганизмов, которые характеризуются способностью окислять серу и (или) ионы железа (П). Многие из этих микроорганизмов способны увеличить скорость окисления сульфидных минералов по сравнению с простыми системами химического окисления. Все это стимулирует множество исследований возможного использования таких микроорганизмов для новых простых и экономичных гидрометаллургических процессов переработки металложелезистых руд и сульфидных минеральных концентратов.

**Химизм бактериального окисления сульфидных минералов.** Об активности роли бактерий в окислении сульфидных минералов сложно судить из-за невозможности разделить те реакции, которые непосредственно ускоряются бактериями, и те, которые протекают просто как химические (табл. 8.1).

Часто говорят о *«прямом»* и *«косвенном»* действии бактериальных выщелачивающих систем. Эти термины относятся соответственно к растворению сульфидных пород непосредственно бактериями и с помощью железа(III), образовавшегося при бактериальном окислении железа (II).

Практически невозможно экспериментально изолировать каждую реакцию, так как при нормальном выщелачивании наблюдается их сумма, значение которой гораздо больше, чем каждой реакции по отдельности.

Окислительные реакции, происходящие при бактериальном выщелачивании сульфидных минералов, могут лучше всего

быть представлены при рассмотрении окисления пирита $Fe_2S$ – минерала сульфида железа (II).

**Пирит** является самым важным сульфидным минеральным субстратом для активно выщелачивающих бактерий. Он содержит почти равные количества железа (II) и серы, которые являются основными источниками энергии для таких бактерий. Пирит – самый распространенный из встречающихся в природе сульфидных минералов и присутствует как сопутствующий минерал практически во всех промышленных сульфидных рудных отложениях.

Переход железа из минерала в раствор сопровождается соответствующим возрастанием содержания сульфата и серной кислоты, как это видно по падению значений pH. Не весь сульфид в пирите окисляется немедленно до сульфата во время выщелачивания – часть превращается сначала в элементарную серу, а затем тоже окисляется до серной кислоты.

Аналогичны уравнения для процессов бактериального окисления других сульфидных минералов, таких как минералы меди и цинка.

**Халькопирит $CuFeS_2$** – наиболее важный медный минерал, выщелачивается в присутствии бактерий. Аналогично и при растворении сфалерита ZnS будет образовываться некоторое количество трехвалентного железа, так как железо (II) присутствует в большинстве природных образцов сульфида цинка.

Аналогичны уравнения для процессов бактериального окисления других сульфидных минералов, таких как минералы меди (халькопирит) и цинка. Так, при растворении **сфалерита** ZnS будет образовываться некоторое количество трехвалентного железа, так как сульфат железо (II) присутствует в большинстве природных образцов сульфида цинка.

В общем виде выщелачивание сульфидов всех металлов может быть представлено следующим уравнением:

$$MeS + Fe_2(SO_4)_3 \xrightarrow{\text{бактерии}} MeSO_4 + 2FeSO_4 + S. \quad (9)$$

Это уравнение показывает, что железо и бактерии, окисляющие железо и серу, играют важную роль в таких реакциях. Окисление ими железа (II) и серы обеспечивает условия, необ-

ходимые для растворения сульфидных минералов, т. е. поддерживает уровень концентрации железа (III) и серной кислоты.

Таблица 8.1

Окислительные реакции, происходящие при бактериальном выщелачивании сульфидных минералов

| Сульфидный минерал | Процесс | Уравнение реакции | | Характеристика |
|---|---|---|---|---|
| Пирит $FeS_2$ | Окисление в присутствии $O_2$, $H_2O$ и $H_2SO_4$ | $2FeS_2 + 7O_2 + 2H_2O \rightarrow 2FeSO_4 + 2H_2SO_4$ | (1) | В реакциях образуется $FeSO_4$, а элементарная сера, как побочный продукт, получается только во второй реакции. Скорость протекания реакции (при нормальных условиях) медленная из-за образования слоя продуктов реакции (серы) на поверхности частиц пирита, что приводит к протеканию реакции в диффузионной области |
| | | $2FeS_2 + 2H_2SO_4 + O_2 \rightarrow 2FeSO_4 + 2H_2O + 4S$ | (2) | |
| | Химическое окисление | $4FeSO_4 + 2H_2SO_4 + O_2 \rightarrow 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2O$ | (3) | Железо (II) и элементарная сера окисляются до железа (Ш) и серной кислоты соответственно |
| | Бактериальное окисление | $2S + 3O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{бактерии}} 2H_2SO_4$ | (4) | |
| | Окисление пирита протекает при различных химических условиях, сульфат железа (II) | $FeS_2 + Fe_2(SO_4)_3 \xrightarrow{\text{бактерии}} 3FeSO_4 + 2S$ | (5) | Сульфат железа (II) и элементарная сера образующиеся в реакции (5), вновь окисляются бактериями до сульфата железа (III) и серной кислоты (реакции (3) и (4)) |

Продолжение табл. 8.1

| Сульфидный минерал | Процесс | Уравнение реакции | | Характеристика |
|---|---|---|---|---|
| | взаимодействует с пиритом | | | |
| Пирит $FeS_2$ | Суммарное уравнение, описывающее окисление пирита в присутствии бактерий | $4FeS_2 + 15O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{бактерии}} 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2SO_4$ | (6) | Эта реакция протекает быстро в кинетической области. Продукты реакции (например, сера) не образуются на поверхности пирита, так как они окисляются бактериями |
| Халькопирит $CuFeS_2$ – важный медный минерал | Биовыщелачивание | $CuFeS_2 + 2Fe_2(SO_4)_3 \xrightarrow{\text{бактерии}} CuSO_4 + 5FeSO_4 + 2S$ | (7) | Побочные продукты сульфат железо(II) и сера – вновь окисляются бактериями до сульфата железа (III) и серной кислоты |
| Сфалерит ZnS | Биовыщелачивание | $ZnS + Fe_2(SO_4)_3 \xrightarrow{\text{бактерии}} ZnSO_4 + 2FeSO_4 + S$ | (8) | Как видно, в продуктах реакции опять присутствуют субстраты для биоокисления |

**Использование бактериального окисления сульфидных минералов в горнодобывающей промышленности.** Существует множество различных путей использования бактериального окисления сульфидных минералов в горнодобывающей промышленности. Однако все они основаны на стимуляции роста бактерий, способных к окислению двухвалентного железа и соединений серы в низших степенях окисления, находящихся либо в растворе, либо первоначально в твердой фазе. Постоянный поиск методов извлечения металлов, которые были бы менее энергоемки, более экономичны и

привлекательны с экологической точки зрения, способствует усовершенствованию процессов, зависящих от роста микроорганизмов.

Метод получения металлов из руд или концентратов бактериальным окислением сульфидных минералов имеет ряд *преимуществ*:

– отличается гибкостью и может быть применен для переработки как различных сульфидных минералов, так и их смесей;

– способы его реализации могут варьировать от простого фильтрования сквозь неподвижный слой до выщелачивания в реакторе с мешалкой;

– не требует высоких рабочих давлений и температур;

– является самоподдерживающимся благодаря образованию растворителя в виде раствора сульфата трехвалентного железа;

– все жидкие стоки образуются в виде водных растворов, которые могут быть легко нейтрализованы, и, кроме того, не образуется никаких вредных газообразных побочных продуктов;

– процесс не зависит от масштабов его проведения;

– может быть использован в непосредственной близости от места добычи перерабатываемого минерала;

– включает реакции, которые не могут быть проведены только химическим способом.

Системам для извлечения металлов с помощью бактериального выщелачивания присущи и недостатки, важнейшим из которых является необходимость поддержания активной культуры нужных микроорганизмов. В связи с этим требуется управление температурой реакции и внесение соединений и элементов, необходимых для ее роста. Нужны такие условия, в которых ничто не препятствовало бы росту микроорганизмов и не ухудшало процесс выщелачивания. Кроме того, бактериальное выщелачивание – гораздо более медленный процесс по сравнению с процессом химического выщелачивания. Скорость окисления минералов тесно связана со скоростью роста используемых микроорганизмов, а эта последняя есть величина относительно постоянная.

Бактериальное окисление сульфидных минералов может использоваться для их переработки по ряду направлений, которые могут быть классифицированы следующим образом:

1) извлечение металлов из бедных руд в кучах, отвалах или методом выщелачивания in situ;

2) полное выщелачивание концентратов минерала или смеси минералов фильтрацией сквозь неподвижный слой или в реакторе с перемешиванием;

3) частичное выщелачивание концентратов смеси минералов для удаления загрязнений или для того, чтобы сделать минеральное сырье пригодным к переработке по другим технологиям;

4) использование бактериального выщелачивания для получения выщелачивателя в виде кислого раствора сульфата трехвалентного железа для последующей переработки других рудне пригодных для поддержания бактериального роста.

В промышленных масштабах применяются только выщелачивание куч, отвалов и выщелачивание in situ. Однако проводились и проводятся интенсивные исследования и различные эксперименты для изучения возможности промышленного использования методов бактериального окисления.

### 8.4. Бактериальное выщелачивание куч и отвалов

Выщелачивание куч и отвалов в основном заключается в извлечении металлов из отходов горнодобывающей промышленности или побочных руд, которые либо слишком бедны для того, чтобы их переработка обычнымиметодами была выгодна, либо слишком сложны по составу, чтобы из них можно было получить концентрат для плавки [113].

**Выщелачивание куч**

Выщелачивание куч отличается от выщелачивания отвалов, поскольку применяется для руд, подверженных более быстрому выщелачиванию и с более высоким содержанием металла. Из этих руд, после того как их добудут, измельчат до необходимых для выщелачивания размеров и транспортируют в специальные места, формируются кучи, в которых происходит выщелачивание.

Выщелачивание куч позволяет извлечь металлы из руд за несколько месяцев, в то время как для извлечения такого же количества металла при переработке металлсодержащих отходов (бедных отвалов) могут понадобиться годы.

Бактериальное выщелачивание куч применяется во многих странах для извлечения меди, особенно там, где исходная суль-

фидная форма перерабатываемых руд частично окислена. Опыт, полученный при формировании куч для выщелачивания, теперь интенсивно используется для операций химического выщелачивания, например, извлечения золота разбавленными растворами цианидов (рис. 8.4).

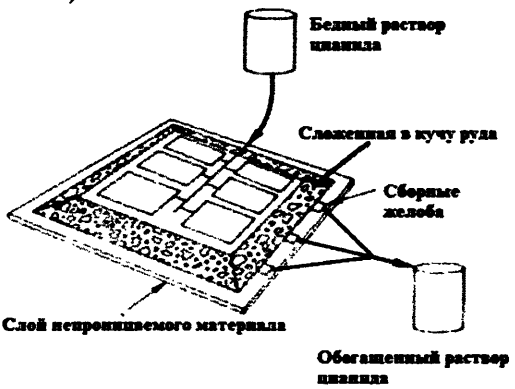



Рис. 8.4. Куча руды для выщелачивания золота традиционным цианидом натрия как аналог для биовыщелачивания

**Выщелачивание отвалов**

Выщелачивание отвалов также практикуется во многих странах и, по-видимому, это наиболее широко используемый вид бактериального выщелачивания. Оно применяется для переработки сырья, обычно рассматриваемого как отходы при крупномасштабной добыче открытым способом, либо для переработки накопившихся в течение ряда лет отвалов, содержащих медь в рассеянном состоянии.

В США примерно 15 % меди извлекается с помощью выщелачивания отвалов. При таком выщелачивании образуется раствор с меньшей концентрацией металла, чем при выщелачивании куч.

Переработка как куч, так и отвалов подобна процессу природного бактериального выщелачивания, а главное отличие состоит в управляемой оптимизации процесса извлечения металла.

Как отвалы, так и кучи образованы из измельченной руды, уложенной на водонепроницаемое наклонное основание для того, чтобы обеспечить сбор раствора, профильтровавшегося сквозь слой руды, и избегнуть потерь за счет его просачивания

до грунтовых вод. Выщелачивающая жидкость в виде кислого, содержащего бактерии раствора сульфата трехвалентного железа подается насосами на верх кучи руды и просачивается сквозь нее. Эти растворы применяют путем налива, распыления или инжекции. Распыление часто осуществляется с помощью перфорированных пластмассовых труб, уложенных поверх кучи руды; при этом достигаются лучшая оксигенация и более равномерное смачивание поверхности отвала или кучи. Необходим хороший контакт минеральной массы и раствора, особенно при использовании системы инжекции раствора при повышенном испарении в условиях засушливого климата.

Богатые металлом растворы, выходящие из отвалов, направляются для сбора в пруды для перекачки на перерабатывающее предприятие, где искомый металл может быть извлечен. Металл извлекают или простым осаждением, или более сложным путем, включающим либо ионный обмен, либо экстракцию растворителем для концентрации и удаления металла из выщелачивающего раствора. Дальнейшее извлечение производят либо электролизом, либо селективным осаждением. Отработанные выщелачивающие растворы, содержащие в основном растворенное железо, либо перекачиваются в окислительные пруды для регенерации, либо возвращаются прямо в кучи или отвалы. Прежде чем выщелачивающая жидкость может быть возвращена в процесс, в окислительных прудах происходит превращение двухвалентного железа в трехвалентное.

**Типичная схема переработки куч или отвалов медной руды выщелачиванием.** Типичная схема переработки куч или отвалов медной руды выщелачиванием приведена на рис. 8.5.

Как видно из рис. 8.5, экстракция растворителем используется для удаления и концентрирования меди из выщелачивающего раствора и предшествует электролитическому получению металла.

Выщелачивание отвалов применяется, например, на руднике «Kennecott Chino» в штате Нью-Мексико (США), где суточное количество горнорудных отходов составляет $\approx 7 \cdot 10^4$ т.

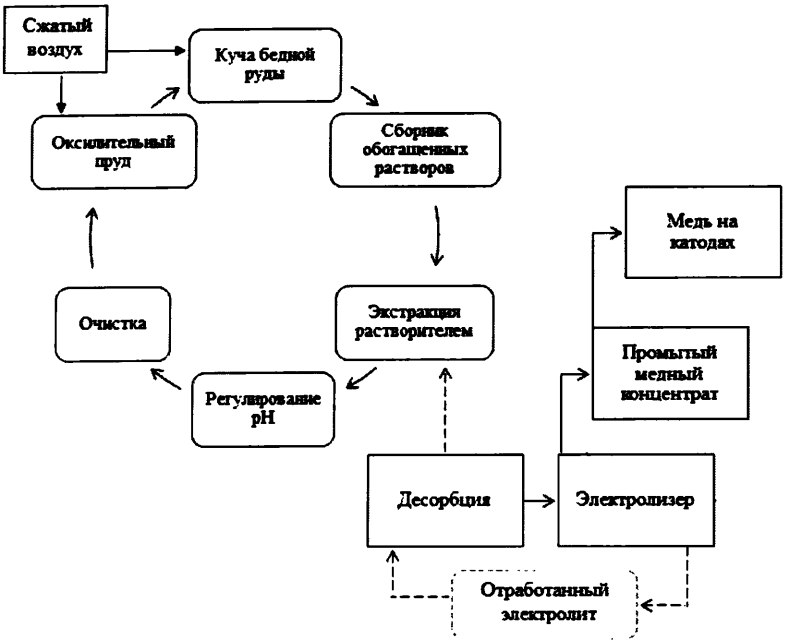



Рис. 8.5. Блок-схема бактериального выщелачивания отвалов или куч руды для извлечения меди

**Технологические параметры.** Высота отвалов – 25–30 м. Для удаления меди из выходного раствора (концентрация ≈ 1,4 г/л) в него добавляют железный лом, что необходимо для поверхностного осаждения меди, которая потом удаляется с помощью сопел высокого давления. Суточная добыча составляет примерно 45–50 т.

Скорость извлечения металла при промышленном выщелачивании отвалов или куч руды зависит от многих факторов:

1. Скорость фильтрования раствора и прохождения воздуха в глубь руды. Этот фактор существенно зависит от размера частиц и объема пустот.

Быстрое фильтрование приводит:

– к быстрому проникновению кислорода и выщелачивающего раствора вглубь рудного материала,

– к быстрому выносу растворенного металла,

– образованию растовров с низким содержанием выделяемого металла,

– к вымыванию бактерий, содержащихся в руде,

– к переносу мелкодисперсного материала к основанию кучи или отвала, что сопровождается уплотнением этого материала и последующей забивкой стока.

2. Размер частиц перерабатываемого материала. Размер частиц определяет площадь свободной поверхности, доступной для бактериального выщелачивания. Однако снижение размера частиц для увеличения доступной для реакции поверхности приводит к снижению скорости фильтрования и аэрации.

3. Минералогическая характеристика перерабатываемой руды – это размеры кристаллов минерала и пористость руды.

Если размер частиц выщелачиваемого материала не задается специально, то применяемая скорость выщелачивающего раствора будет зависеть от глубины фильтрования, площади поверхности выщелачиваемого материала и требуемой концентрации металла в выходном выщелачивающем растворе.

Большая часть процессов аэробного выщелачивания отвалов и куч проводится циклично с перерывами между отдельными стадиями применения раствора. Это важно для проникновения воздуха вглубь массы руды.

4. Аэрация процесса. Бактериальная активность сильно варьирует внутри кучи руды, она выше там, где условия способствуют росту бактерий, например на участках, имеющих адекватную аэрацию. Так как реакции окисления сульфидных минералов экзотермичны, то в середине кучи за счет изоляции может происходить разогрев, который пресекает рост мезофильных штаммов, но способствует росту термофилов. Однажды инициированный процесс бактериального выщелачивания с последующим получением металла из куч руды или отвалов трудно управляем; поддержание проницаемости и, следовательно, потоков раствора и воздуха, является основной практической задачей, решение которой необходимо для поддержания бактериальной активности и скорости выщелачивания металла.

Как видим, некоторые факторы относятся к характеристикам перерабатываемой руды, другие – к поддержанию активной культуры требуемых микроорганизмов в контакте с субстратом.

### 8.5. Бактериальное выщелачивание руды *in situ*

Выщелачивание *in situ* используется в тех случаях, когда минералы могут подвергнуться выщелачиванию без извлечения их из земли с помощью *шахт*. Такой метод находит применение в старых подземных разработках и бедных месторождениях, где извлечение руды с помощью шахт невыгодно, но где достаточно много металла, чтобы финансировать его извлечение с помощью бактериального выщелачивания.

Существующие шахты или новые скважины, подводящие к руде, являются каналами и накопителями для выщелачивающих растворов, вводимых в руду.

Руда может быть предварительно раздроблена взрывом для увеличения ее проницаемости и площади поверхности для выщелачивания, и растворы могут инжектироваться или распыляться в раздробленном материале под землей.

Раствор, профильтровавшийся до нижнего горизонта месторождения, выкачивается на поверхность для извлечения металла, а затем регенерируется и возвращается в процесс.

Преимущество этого метода выщелачивания в том, что при его использовании не нарушается поверхность месторождения и не остаются огромные груды отходов после выщелачивания в качестве безобразных следов процесса. Кроме того, процесс не зависит от погодных условий на поверхности.

Выщелачивание *in situ* – гораздо более трудноуправляемый процесс, чем обычное выщелачивание. Выщелачивающие растворы могут мигрировать в непредсказуемых направлениях, причем возможно их соединение с естественными грунтовыми водами. Этот метод применяется как на медных, так и на урановых месторождениях как способ извлечения остатков металла.

На многих рудниках во всем мире предпринимались попытки выщелачивания in situ, но эти попытки не получили развития. Разработка рудника, содержащего сульфидные руды, со временем приводит к появлению в нем микроорганизмов, окисляющих железо и серу. Если условия подходят для выщелачивания, т. е. в руднике очень сыро, тогда бактериальное выщелачивание может стать существенной помехой и привести к издержкам, так как кислые рудничные воды часто образуются в

больших количествах. Удалять эти кислые растворы из шахты дорого из-за коррозии насосов и труб. Поэтому перед извлечением их необходимо нейтрализовать.

**Биовыщелачивание минеральных концентратов**

Обычно производство большинства металлов включает в качестве начальной стадии концентрирование, или экстракцию, металлсодержащего минерала из руды.

Эти минеральные концентраты, в которых часто содержание металла на порядок больше, чем в исходной руде, перевозятся затем на большие расстояния для пирометаллургической или гидрометаллургической переработки в чистый металл. Концентраты редко перерабатываются в металл прямо на месте добычи, так как это сопряжено с большими капитальными и текущими затратами. Однако, если бы это было возможно, это дало бы очень большие выгоды.

Бактериальное выщелачивание концентратов сульфида одного или нескольких металлов имеет как недостатки (низкая скорость выщелачивания, неполная растворимость некоторых минералов), так и преимущества (осуществимость переработки концентратов в малом масштабе). Так, экономически выгодно получать медь из халькопиритного концентрата.

На рис. 8.6 приведена схема процесса выщелачивания меди.

Как видно из рис. 8.6, в процессе непрерывного биовыщелачивания получают обогащенный раствор, содержащий 30–50 г/л меди, при скорости процесса 560–725 мг/(л-ч). Скорость экстракции может возрастать при использовании серебра в качестве катализатора.

Разработаны биотехнологии получения цинка, меди и кадмия из смешанных сульфидных концентратов, содержащих сульфид свинца.

На рис. 8.7 показана биотехнологическая блок-схема переработки смешанного сульфидного концентрата, содержащего свинец, цинк, медь и кадмий.

При данной технологии была достигнута степень общей экстракции растворяемых металлов 94 % с попутным образованием осадка выщелачивания, содержащего обогащенные минералы свинца.

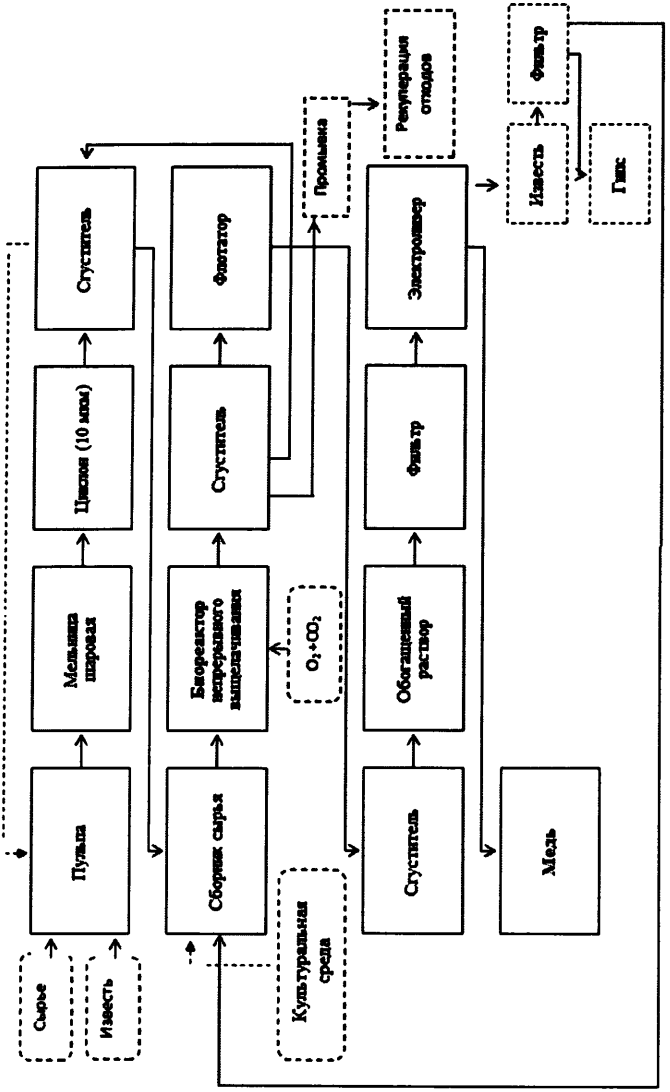



Рис. 8.6. Схема бактериального выщелачивания медного концентрата для получения меди

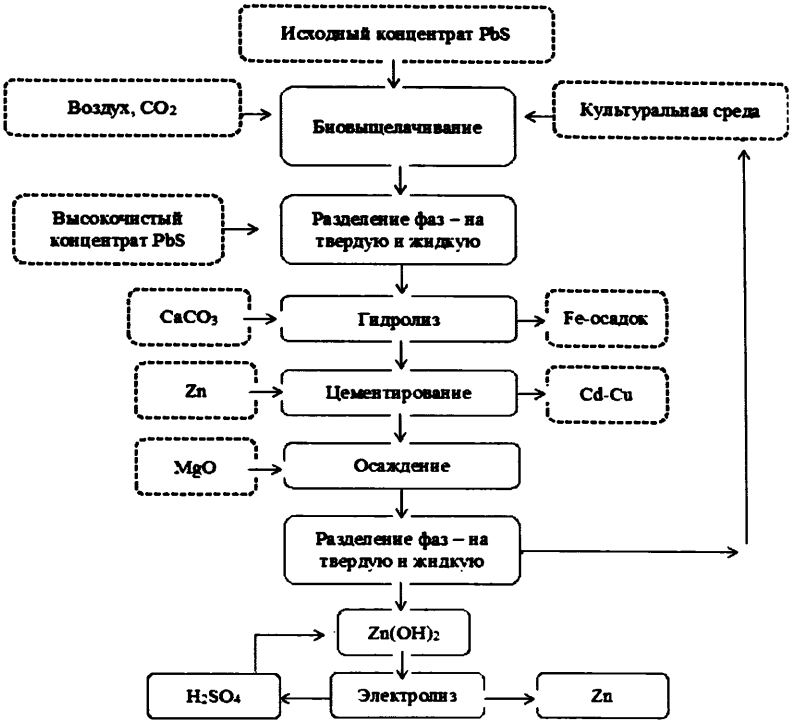



Рис. 8.7. Предполагаемый вариант схемы для бактериальной переработки смешанного сульфидного концентрата, содержащего Pb, Zn, Cu и Cd

Описанный на рис. 8.7 биотехнологический процесс успешно применяется для переработки образцов, содержащих никель.

Выщелачивание концентратов находит также применение для селективного удаления нежелательных примесей из минерального сырья перед его переработкой с помощью обычной плавки. Объем минерального концентрата тесно связан с количеством содержащихся в нем загрязнений, и удаление или снижение содержания нежелательных элементов, например, мышьяка, существенно влияет на экономичность переработки руды.

На многих шахтах концентраты сульфидных минералов производят в малых количествах как побочный продукт при добыче несульфидных минералов таких металлов, как олово и вольфрам. Переработка этих сульфидных побочных продуктов с

помощью бактериального выщелачивания может дать вклад в годовую прибыль небольших рудников и, кроме того, облегчить проблему ликвидации этих отходов.

Кислые растворы сульфата железа (III) получают в отдельном реакторе для последующего выщелачивания урансодержащих руд (гл.6, рис. 6.11).

Отработанный раствор, содержащий, в основном, ионы железа (II), может быть возвращен в бактериальный реактор для регенерации. Аналогичные системы могут быть созданы для переработки руд цинка и меди.

Образуемые бактериями растворители использовали в лабораторных условиях, и было показано, что они применимы для быстрой переработки таких сульфидных руд, для которых непосредственное выщелачивание нежелательно.

Поверхностная обработка сульфидных минералов бактериальными растворителями влияет на химические свойства их поверхности, что меняет их поведение в таких процессах, как флотация. Эта технология может улучшить очистку угля от пирита при флотации угля и рассматривается как альтернативный способ полного выщелачивания пирита в угле.

Образуемые бактериями кислые растворы сульфата железа (III) и способность бактерий регенерировать их привлекли внимание не только горнорудной, но и других отраслей промышленности. Было показано, что эти растворы могут применяться для очистки от ржавчины стальных поверхностей, например, в емкостях нефтеналивных судов. Любые отрасли, в которых находят применение кислые растворы сульфата железа (III), могут быть потенциальными потребителями бактериальных процессов, в которых такие растворы образуются.

Способность определенных микроорганизмов окислять железо и соединения серы вызывает в последние 20 лет все возрастающий интерес к ним в горнорудной промышленности. Их использование для растворения или выщелачивания сульфидных минералов представляет собой альтернативный путь получения некоторых металлов.

Хотя уран и не встречается в природе в сульфидах, его основная форма $UO_2$ часто связана с пиритом. Выщелачивание может происходить как непрямо, с участием сульфата железа

(III), дающего растворимую соль $UO_2SO_4$, так и прямо, с помощью *T. ferrooxidans*, окисляющей уран по уравнению

$$2UO_2 + O_2 + 2H_2SO_4 \rightarrow 2UO_2SO_4 + 2H_2O \qquad (10)$$

Схема добычи урана, обеспечивающая степень извлечения 30 %, дана на рис. 6.11 (гл.6.).

Более сложное выщелачивание в аппаратах еще не нашло широкого применения, хотя было показано, что оно может применяться в различных случаях. Необходимо более глубокое понимание основных механизмов бактериального выщелачивания минералов, так как в опубликованных работах, относящихся к окислению различных минералов, данные о скорости и количестве окисляемого материала сильно различаются. Это показывает, что необходима дополнительная информация для определения наиболее эффективных видов бактерий, способов их культивирования, а также путем их использования и внесения в выщелачиваемые минералы. Условия бактериального выщелачивания и проекты реакторов оптимизируются в каждом случае применительно к перерабатываемой руде.

## 8.6. Характеристика биометаллургических технологий переработки руд и концентратов меди, золота

Биометаллургические технологии разработаны и внедрены для переработки руд и концентратов меди, урана, золота и других металлов.

**Выщелачивание меди из отвалов бедной руды (кучное) и из рудного тела в местах залегания (подземное выщелачивание).** Методы биогеотехнологии основаны на бактериально-химическом выщелачивании цветных металлов, производимых из отвалов бедной руды (кучное) и из рудного тела в местах залегания (подземное выщелачивание). Более распространено кучное выщелачивание меди.

Орошение дробленой руды в отвале или в рудном теле осуществляется водными растворами $H_2SO_4$, содержащими $Fe^{3+}$, $O_2$ и бактерии:

1. Хемолитотрофные бактерии *A.ferrooxidans, A.thiooxidans, L.ferrooxidansu, F. acidiphilum* при нормальной и пониженной температуре окисленеют сульфидные минералы при pH 1,0–2,0.

2. Умеренно-термофильные бактерии р. *Sulfobacillusu A.caldus* действуют в зонах разогрева руды в результате экзотремических окислительных процессов при температуре 55 °С.

3. Термофильные бактерии р. *Acidiamusu Metallosphaera* участвуют в окислительных процессах при температуре 50–80 °С.

Биореакторный процесс извлечения микроорганизмами металлов из концентратов называется *чановым*. Бактериально-химическое окисление концентратов (продукт обогащения руды) производят в непрерывных условиях в каскаде последовательно соединенных реакторов с перемешиванием и аэрацией при 30 °С для мезофилов, от 45–40 °С для умеренных термофилов и 60–70 °С для облигатных термофилов. Схема переработки концентратов может быть замкнутой. Оборотные растворы после частичной или полной регенерации используют для выщелачивания или сбрасываются в хвостохранилища.

**Переработка золотомышьяковых концентратов.** Золото и серебро встречаются в свободном состоянии и в виде вкраплений в кристаллических решетках сульфидных минералов, главным образом в арсенопирите (FeAsS) и пирите ($FeS_2$). В рудных месторождениях сосредоточено 75 % прогнозных запасов золота.

Для извлечения золота применяют комбинированную технологию, включающую бактериальное окисление арсенопирита и пирита. Процесс осуществляется сообществом микроорганизмов: при 30 °С – *A. ferrooxidans*и представителей родов *Sulfobacillus, Leptospirillum* и *Ferroplasma*. Во всех реакторах сообщество достигает стабильной плотности популяции $10^9$–$10^{10}$ кл/мл. Время окисления сульфидных минералов в каскаде реакторов не превышает 100–120 часов. Для извлечения золота из продуктов бактериального окисления используется способ цианирования.

Дополнительно технология позволяет перевести мышьяк в нетоксичные соединения. При pH 1,5–2,0 и молярном отношении Fe/As > 4 получается нерастворимый экологически безопасный твердый содержащий мышьяк продукт.

**Комбинированные технологии переработки медно-цинковых и медных руд.** Промышленные типы цинксодержащих

руд представлены медно-цинковыми, свинцово-цинковыми и медно-свинцово-цинковыми, медно-цинко-пиритными рудами. В такой системе минералов происходит селективное бактериально-химическое окисление ZnS, имеющего более низкий ОВП (окислительно-восстановительный потенциал), и выщелачивание цинка из концентрата в плотной пульпе (20 %) с помощью *A.ferrooxidans.* В раствор переходят также кадмий и ряд других элементов. Так, например, за 72–96 ч извлекается в раствор до 92–97 % Zn и Cd при извлечении Cu из вторичных минералов и Fe – соответственно около 25 и 5 %. Этот способ позволяет селективно извлечь цинк и получить медно-кадмиевый концентрат.

Основной задачей при переработке медно-мышьяково-оловянных концентратов являются селективное удаление мышьяка как вредной примеси и получение из остатков выщелачивания медных и оловянных концентратов. Оловосодержащие концентраты содержат пирит, арсенопирит и минералы олова в виде оксидов. В этой смеси минералов бактерии окисляют арсенопирит как минерал, имеющий более низкий ОВП. Это позволяет селективно удалить мышьяк как вредную примесь и получить оловянный и медный концентраты.

Из вышеизложенного следует, что технологические параметры биометаллургических технологий переработки руд и концентратов основаны на следующих ключевых позициях:

1. Получение высокоактивных штаммов микроорганизмов, используемых в биогеотехнологиях. Методология основана на использовании генетических (селекция, индуцированный мутагенез), биотехнологических (генная и клеточная инженерия), микробиологических (отбор высокоактивных штаммов микроорганизмов при воздействии различных факторов на рост культуры) приемов.

При получении высокоактивных штаммов важны следующие характеристики:

1) скорость накопления биомассы (удельная скорость роста);

2) скорость фиксации $CO_2$;

3) активность окисления сульфидов (по накоплению в растворе ионов металлов и по потреблению $O_2$);

4) устойчивость бактерий к ионам тяжелых металлов;

5) скорость адгезии бактерий на твердых частичках и распределение их между твердой и жидкой фазами в пачках;

6) сохранение свойств бактериями при их хранении.

2.Биоокисление протекает непрерывно и замкнуто в каскаде биореакторов.

**Очистка промышленных стоков.** Одна из важнейших проблем при получении металлов биометаллургическим путем – очистка промышленных сточных вод. Многие микроорганизмы способны либо сорбировать ионы металлов, либо их осаждать. Метод осаждения металлов в виде сульфидов заключается в том, что сульфатредуцирующие бактерии образуют $H_2S$, который осаждает металлы из растворов практически полностью. Так, из растворов, содержащих 8,6 г/л Cu, извлечение Cu составляло 98,5 %. При сорбции металлов из растворов они накапливаются в биомассе. Например, Ag – до 30 %, U– до 15 % от массы сухих клеток. В основном этот процесс связан с клеточной стенкой.

## 8.7. Кучное и подземное выщелачивание химическим и бактериальным выщелачиванием

Кучное выщелачивание – это способ переработки химическим или бактериальным выщелачиванием попутно добытых забалансовых и бедных балансовых крупнокусковатых руд, заскладированных в отвалах, извлечение из которых полезных компонентов обычными гидрометаллургическими или обогатительными методами (выщелачивание в пачуках, автоклавах и других аппаратах) нерентабельно.

**Кучное химическое выщелачивание.** Кучному выщелачиванию подвергают легкообогатимые руды, в которых, например, золото и серебро находятся преимущественно в цианируемой (химически вскрываемой) форме, т.е. свободное (самородное) или в сростках в основной своей массе.

В табл. 8.2 показаны технологические параметры кучного выщелачивания.

Способ кучного выщелачивания позволил отрабатывать не только крупные месторождения бедных руд, но и вскрышные породы, техногенное золотосодержащее сырье (хвосты обогащения руд цветных и драгоценных металлов, и небольшие по запасам месторождения (до 1–2 т), расположенные в малоосвоенных районах.

Таблица 8.2

Технологические параметры кучного выщелачивания

| № п/п | Технологические параметры выщелачивания | |
|---|---|---|
| | Кучное химическое | Кучное бактериальное |
| 1 | Рудоподготовка (по необходимости: дробление, грохочение, шихтовка, окомкование) | |
| 2 | Выбор и подготовка площадки под кучное выщелачивание | |
| 3 | Подготовка гидроизоляционного материала | |
| 4 | Складирование руды в штабель (кучу) | |
| 5 | Орошение рудного штабеля цианидным раствором | Орошение дробленой руды (например, медной) в отвале или в рудном теле осуществляется водными растворами $H_2SO_4$, содержащими $Fe^{3+}$, $O_2$ и бактерии. |
| 6 | Процесс выщелачивания металла | |
| 7 | Дренаж растворов через кучу | |
| 8 | Накопление металлсодержащего раствора в емкости и их отстаивание | |
| 9 | Извлечение металла из раствора | |
| 10 | Плавка осадков (цинковых, катодных и др.) | |
| 11 | Детоксикация отработанных рудных штабелей (хвостов выщелачивания) | Обезвреживание отработанных рудных штабелей (хвостов выщелачивания) |
| 12 | Рекультивация отвалов и нарушенных земель | |

*Преимущества*: избирательность, простота, дешевизна.

*Недостатки:* токсичность от использования цианидов; необходимость обезвреживания образующихся стоков.

Контрольные вопросы

1. Как развивается биотехнология в металлургии?
2. Минералы, являющиеся природным источником для бактериального выщелачивания.
3. Микроорганизмы, участвующие в выщелачивании сульфидных минералов. Оптимальные условия для бактериального выщелачивания.

4.Реакции, протекающие при бактериальном выщелачивании сульфидных минералов.

5. Бактериальное окисление сульфидных минералов в горнодобывающей промышленности.

6. Преимущества и недостатки метода получения металлов бактериальным окислением сульфидных минералов.

7. Выщелачивание куч и отвалов. Схема переработки медной руды выщелачиванием. Технология и аппаратурное оформление технологии кучного бактериального выщелачивания. Выщелачивание in situ. Преимущества и недостатки метода. Способы выщелачивания минеральных концентратов.

8. Технологические параметры и схема бактериального выщелачивания концентратов сульфида металлов.

# 9. БИОТЕХНОЛОГИЯ В МАШИНОСТРОЕНИИ, НЕФТЕДОБЫВАЮЩЕЙ, ХИМИЧЕСКОЙ И ДРУГИХ ОТРАСЛЯХ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

## 9.1. Биотехнология в машиностроении

Биотехнология для машиностроения развивается по трем основным направлениям:

1) биотехнологическое производство биоэтанола и биодизеля, используемые для двигателей внутреннего сгорания (см. гл. 6);

2) биотехнология в химической промышленности производит растворители лаков (1-бутанол, ацетон), которые применяются при покраске автомобилей;

3) биотехнология производства средств защиты от биоповреждений.

В табл. 9.1 кратко охарактеризован биотехнологический метод производства растворителей лаков (1-бутанол, ацетон), используемые при покраске автомобилей.

Таблица 9.1

Биотехнология производства органических растворителей

| № п/п | Показатель | Органические растворители: 1-бутанол, ацетон |
|---|---|---|
| 1 | Суммарное уравнение | Ацетон ($C_3H_6O$), бутанол ($C_4H_{10}O$). |
| 2 | Продуценты | Бактерии *Clostridium acetobutilicum*, масляно-кислые бактерии |
| 3 | Технология | Производят путем сбраживания зерновых и мелассы. Процесс осуществляется в анаэробных условиях при температуре 37–42°С, pH 5–7 в течение 24–48 часов. Практически из 3 кг крахмала получается 1 кг органических растворителей |
| Во многих отраслях промышленности для технических нужд, в том числе в автомобилестроении | | |

Как видно из табл. 9.1, производителями рассматриваемых растворителей являются *Clostridium acetobutilicum*. Следует от-

метить, что из 100 кг глюкозы производят примерно 38 г смеси 1-бутанол + ацетон (3:1).

**Биоповреждения: экотехнологическая проблема.** Для машиностроения и приборостроения очень существенным уроном являются биоповреждения, происходящие на основе взаимодействия экологических и антропогенно-технологических факторов и проявляющиеся в уменьшении ценности материалов под воздействием живых организмов [51, 63, 64, 67, 107].

Источники биоповреждений (агенты биоповреждений) – это организм/ы, атакующий/е материал, изделие, сооружение, природное сырье и вызывающий/е изменение его свойств в нежелательную для человека сторону. Агент биоповреждений относится к экологической категории, а биоповреждаемый объект и средства защиты (*биоциды*) – к антропогенно-технологическим [51].

***Эколого-технологическая концепция биоповреждения:*** Состав повреждаемых объектов постоянно меняется также, как и перечень повреждающих их видов. В силу ситуативных факторов в каждом конкретном случае биоповреждающие свойства у одних популяций могут проявляться активно, а у других – индифферентно. Важным условием проявления биоповреждающих свойств является окружающая среда во всем многообразии экологических факторов.

В зависимости от биологических повреждений материалы подразделяют по морфологическими признакам и изменению свойств:

К группе морфологических признаков проявления биоповреждений относят:

1) обрастание поверхности мицелием грибов или бактериями, появление окрашенных пятен;

2) появление язв, трещин на поверхности материала;

3) потеря части материала в результате биоповреждений;

4) изменение структуры и состояния материала (желирование топлив, расслоение эмульсий);

5) фибрилляция волокнистых материалов (шерсти, ткани и пр.).

К группе признаков биоповреждений по изменению свойств материалов относят:

1) изменение физико-химических (потеря прочности, набухания резины, потеря адгезии лакокрасочных материалов), оптических (потеря прозрачности стекол оптических приборов) и органолептических (появление дурного запаха при гниении, слизи) свойств.

2) ухудшение электрофизических свойств (снижение электроизоляционных свойств материалов).

Биоциды – химические соединения, используемые для защиты материалов от биоповреждений.

*Требования и токсикологический контроль применения биоцидов*:

Общие: доступность и дешевизна, отсутствие влияния на физико-химические, механические и технические свойства материала.

Специальные: учитывать конкретные особенности защищаемого материала и его эксплуатации (в жидкой – легко растворяться; не вступать в реакцию с защищаемым материалом и др.).

Гигиенические: быть малотоксичными для животных и растений, отсутствие вредного действия (в том числе кумулятивного).

***Классификация*:**

1. По биоцидному действию к химическим средствам защиты от биоповреждений: фунгициды (для защиты от повреждений грибами), бактерициды (от гнилостных, слизе- и кислотообразующих и др. бактерий), альгициды и моллюскициды (защита гидросистем и сооружений от обрастания водорослями и моллюсками), инсектициды (защита древесины, текстиля от термитов и др.насекомых), гербициды (защита сданий и сооружений от высших растений), зооциды (от животных: родентициды – от грызуноы, авициды – от птиц).

2. По химическому составу различают следующие группы биоцидов: неорганические соединения (фунгицид кремнефторид натрия); (галоген) углеводороды и нитросоединения (фунгицид дифенил), спирты, фенолы и их производные (фунгицид ундециловый спирт), альдегиды, кетоны, органические кислоты и их производные (фунгицид фталан, каптан), амины, соли аминов, четвертичные аммониевые соединения (фунгицид хромат циклогексиламин), элементорганические соединения (фунгицид этилмеркурфосфат), гетероциклические соединения (фунгицид оксин).

Ниже дана краткая характеристика основным повреждениям, характерных некоторым техническим изделиям [51, 63, 64, 67]:

***Биоповреждения пластиков.*** Основу пластики составляют полимерные связующие из полимерных смол (полиэтиленовые, поливинилхлоридные, полиамидные и др.), пластификаторы (сложные эфиры ди- и поликарбоновых алифатических и арамотических кислот) и наполнители, обеспечивающие прочность (древесная мука, бумага, волокна и ткани). Биостойкость пластиков определяется химической структурой макромолекул, длиной полимерной цепи, наличием боковых разветвлением и др.

Агенты биоповреждений: грибы родов *Aspergillus* (Аспергиллус), *Trichoderma* (Триходерма), *Penicillium* (Пенициллум), *Cladosporium* (Кладоспориум), *Fusarium* (Фузариум) и др.

Биоповреждения основных компонентов пластики: грибостойки – полиэтилен, полипропилен, полистирол, полиамид, поливинилхлорид; менее грибостойки – поливинилацетат, хлорсульфированный полиэтилен и др.; эфиры ароматической более стойки по сравнению с эфирами алифатической дикарбоновой кислот; наполнители микробиологически неустойчивы.

***Биоповреждения резины***

Резинотехнические изделия изготавливаются на основе эластомеров – полимеров с гибкими линейными макромолекулами (каучук). Микробиологические повреждения происходят на основе старения резин под действием внешних факторов.

Агенты биоповреждений: бактерии рода *Acetobacter* (Ацетобактеры), *Pseudomonas*(Псевдомонас), актиномицеты рода *Streptomyces*(Стрептомицес), *Actinomyces* (Актиномицес), грибы рода *Fusarium*, *Aspergillus*.

Биостойкость выше по мере увеличения длины макромолекулярной цепи. Микроорганизмы легче утилизируют низкомолекулярные компоненты каучуков. Натуральный каучук менее, искусственный более биоустойчив.

***Биоповреждения лакокрасочных покрытий.*** Признаки проявления биоповреждений: серо-зеленые, бурые, темные и другие окрашенные пятна, и налеты плесени мицелия грибов и бактериальной слизи на окрашенных поверхностях в местах с повышенной влажностью, растрескивание и отслаивание покрытий, образование бугров и отверстий и др. повреждения.

Агенты биоповреждений: грибы родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*(Альтернариа), *Cephalosporium* (Сефалоспориум), *Pullularia* (Пуллулариа), бактерии родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium* (Флавобактеры).

Биостойкость зависит от состава и свойств лакокрасочного материала (пленкообразователя и пигмента) и материала, на которое наносится покрытие (на черных металлах – менее биостойки, чем на цветных). Более биостойки пленкообразующие вещества природного происхождения канифоль вследствие присутствия в его составе терпенов, обладающих фунгицидным свойством, менее – масла растительного происхождения (льняное, хлопковое, подсолнечное и др.). Среди пигментов (придают цвет, регулируют вязкость, улучшают стойкость) более устойчивы оксид цинка, оксид меди (обладают фунгицидными свойствами), не устойчивы мел, алюминиевая пудра, оксид хрома, сажа.

***Биоповреждения топлива и смазочных материалов.*** Ущерб проявляется от ухудшения качества самих продуктов, а также в коррозии резервуаров, топливных и смазочных систем двигателей и т.п., в появлении кожных и аллергических заболеваний у лиц, контактирующих с нефтепродуктами, зараженными микроорганизмами.

***Биоповреждения авиационных топлив***(керосин), ***дизельных топлив*** (тяжелые дистилляторные дизельные топлива для судовых двигателей и тепловозах).

Из нефтяных топлив более биостойки – легкие дистиллятные топлива – бензины, менее – керосины.

Биоповреждения проявляются: скопление в донной части баков шлама – воды с различными загрязнениями, включая бакслизь, ухудшение качества топлива (цвет, запах, загрязнение слизью), отложение осадков мицелия и колоний бактерий на днс, стенках бака, резервуаров, развитие коррозии металлов, разрушение или отслоение защитных покрытий в резервуарах.

Агенты биоповреждений: грибы родов *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, бактерии родов *Pseudomonas*, *Nicrococcus* (Никрококусы), *Micobacterium* (Микобактерии).

Биоповреждения топлив связаны с микробиологическим ферментативным окислением углеводородов с образованием органических кислот, обладающих поверхностно-активными

свойствами и эмульгирующих топлива. Основное условие для микробиологических повреждений – наличие в топливе воды со следами минеральных солей и благоприятная температура.

***Биоповреждения масел, смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей (СОЖ).*** Биоповреждения характерны для двигателей и механизмов с открытыми системами смазки. Менее стойки – технический вазелин, церезин, мыльные смазки.

Агенты биоповреждений: грибы родов *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium* (Чаетомиум), бактерии родов *Pseudomonas*.

Биоповреждения СОЖ проявляются в появлении постороннего гнилостного запаха, изменении окраски, падении вязкости, повышении кислотности и коррозионной агрессивности и др.

Агенты биоповреждений водоэмульсионных СОЖ: грибы родов *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* и дрожжи, бактерии родов *Desulfovibrio* (Десулфовибрио), *E.coli*,*Staphylococcus* (Стафилококки), *Pseudomonas*.

***Биоповреждения металла и металлоконструкций.*** Агенты биокоррозии: грибы родов *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, сульфатвосстанавливающие бактерии (СВБ) родов *Desulfovibrio*, тионовые бактерии рода Тиобациллус, окисляющих серу и соединения серы до серной кислоты; железобактерии рода Галлионелла и Сферотиллус, окисляющих закисное железо до окисного.

Коррозия металлов и металлоконструкций под действием СВБ. Характерная особенность – протекает в анаэробных условиях под действием бактерий Десулфовибрио, Десулфотомацулум и связана с образованием сероводорода и сульфидов в результате восстановления сульфатов. Коррозия железа и стали имеет характер местной и язвенной коррозии. Особенно интенсивно протекает коррозия чугуна под действием СВБ, сохраняющиеся островки частиц углерода рассыпаются от прикосновения.В анаэробных условиях глинистых почв водопроводные трубы с толщиной стенки 6 мм разрушались полностью в течение 3-4 лет. Основная причина возникновения биокоррозии на нефтяных месторождениях – отсутствие воды от сульфатов.

***Защита от биоповреждений сложных технических изделий.*** Факторы биоповреждений: 1) высокая влажность (детали

и узлы радиоэлектронных, оптических и других приборов вследствие наличия негрибостойких материалов и загрязнени; 2) окружающая среда (природные и антропогенные).

Защиту приборов от биоповреждений осуществляют конструкторскими (правильный подбор материалов, гермитизация и др.), санитарно-гигиеническими и химическими методами.

### 9.2. Биотехнология в нефтедобывающей промышленности

В нефтедобывающей промышленности биотехнологическими методами возможно *повышение нефтеотдачи* – регулированием микрофлоры пластов с целью продуцирования нефтевытесняющих соединений, применение полимеров (на базе акриламида), микробных полисахаридов и др. эмульгирующих спецагентов. Изучаются процессы борьбы с биокоррозией нефтепроводов и других коммуникаций (см.выше). Актуальной проблемой являются методы борьбы с разливами нефти, переработки нефтешламов.

**Извлечение остаточной нефти из иссякающих месторождений.** Биотехнологические методы используют для увеличения нефтедобычи. Для вторичной добычи нефти – извлечения из нефтеносных пластов ее остатков, которые адсорбированы различными породами и обычно не вымываются из них водой, может применяться продукт жизнедеятельности бактерии *Xanthomonas campestris* – внеклеточный разветвленный гетерополисахарид – *ксантан*. Ксантановые смолы имеют высокую вязку, безвредны и поэтому их добавляют к буровому шламу при бурении нефтяных скважин: при закачке в пласты под повышенным давлением высвобождает капли нефти из всех трещин и углублений нефтеносных пород.

**Биотехнология производства ксантанов** показана на блок-схеме рис. 9.1.

Как видно из рис. 9.1, процесс ферментации длится до 4 суток. На сегодня производства ксантанов достигает 30 000 т/год.

Для концентрирования потерянной нефти могут быть использованы *бактерии-деэмульгаторы*, например Nocardia sp, Rhodococ.rhodochrous, которые разделяют водную и нефтяную фазы. Одновременно с восполнением потерь нефти, это способ-

ствует очистке сточных вод от нефтяных примесей, создающих угрозу для окружающей среды.

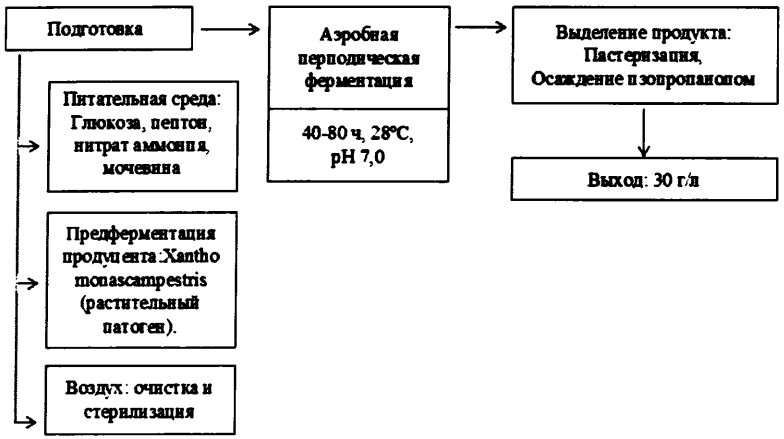



Рис. 9.1. Блок-схема биотехнологии производства ксантана

Транспортировка нефти водным путем неизбежно связана с ее потерями в виде нефтяных пленок на поверхности вод морей и океанов, которые могут быть утилизированы генно-инженерными *штаммами псевдомонад, использующими сырую нефть*. При этом может быть получена бактериальная биомасса, одновременно предотвращено нефтяное загрязнение окружающей среды [84].

Биотехнологические методы борьбы с разливами нефти, переработкой замазученных грунтов и нефтешламов приведены в главе 10 «Биотехнология: сфера *«зеленой»* защиты окружающей среды.

## 9.3. Биотехнология в химической и других отраслях промышленности (строительство, легкая промышленность на примере кожевенного производства)

При рассмотрении вопросов, связанных с развитием биотехнологии в химической промышленности в первую очередь

следует затронуть процесс производства питательных субстратов для ферментации, производимых в химической и нефтехимической промышленности – это природный или нефтяной газ, метанол и этанол.

Как известно, производство органических соединений может осуществляться химическими и биотехнологическими способами. Выбор между химическими и биотехнологическими технологиями при производстве некоторых целевых продуктов зависит от промышленных потребностей, а также эколого-экономических факторов.

В табл. 9.2 перечислены основные преимущества и недостатки биотехнологических подходов в производстве органических продуктов по сравнению с химическими.

Таблица 9.2

Преимущества и недостатки производства органических продуктов биотехнологическими способами перед чисто химическими методами

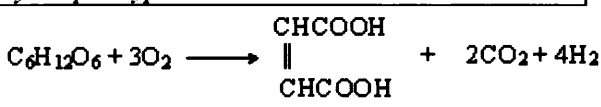
| Преимущества | Недостатки |
|---|---|
| сложные органические молекулы, такие, как белки и антибиотики, не могут практически быть синтезированы химическими способами | могут легко загрязняться посторонней нежелательной микро́флорой |
| Биоконверсия обеспечивает значительно больший выход целевого продукта | целевой продукт присутствует в довольно сложной смеси, что обусловливает необходимость разделения его от примеси ненужных веществ |
| процесс протекает при более низких температурах, менее высоких значениях pH (близких к нейтральному) | |
| биокатализ намного специфичнее по сравнению с химическими катализом | требуют больших количеств воды, которую в итоге необходимо утилизировать |
| при производстве обеспечивается исключительная чистота изомеров одного типа, а не их смесей, как это часто бывает в реакциях химического синтеза | биопроцессы протекают обычно медленнее по сравнению со стандартными химическими процессами |

Большинство органических кислот, вырабатываемых с помощью микроорганизмов, является продуктом переработки пищевого сырья, за исключением кислот, производимых из *н*-парафинов.

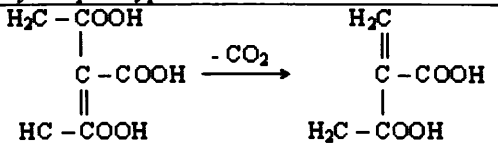
В табл. 9.3 рассмотрены биотехнологии производства некоторых органических кислот, нашедших широкое применение в химической промышленности.

Таблица 9.3

Биотехнологическая характеристика производства органических кислот

| № п/п | Наименование | Биотехнология производства | Продуценты | Применение |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Фумаровая кислота. Промежуточный продукт цикла Кребса: HOOC– CH = CH–COOH. | *Суммарное уравнение*  | | |
| | | Глубинная ферментация на глюкозосодержащих субстратах в отсутствии цинка. Процесс осуществляется в два этапа: 1) рост мицелия осуществляется в среде, содержащей азот; 2) получение кислоты в среде, содержащей источник углерода | Плесневые грибы рода *Rhizopus nigricans* | В производстве лаков и красок. |
| 2 | Циклические кислоты (галловая и койевая) | Реакция катализируется ферментом манназа. Галловую кислоту продуцируют на средах с танином, койевую – на средах, содержащих крахмал, декстрин, | Грибы родов Penicillum (галловая кислота) и Aspergillus (галловая и койевая кислоты). | Для производства чернил |

продолжение табл. 9.3.

| № п/п | Наименование | Биотехнология производства | Продуценты | Применение |
|---|---|---|---|---|
| | | дисахариды, моносахариды, многоатомные спирты или др. источники углерода | | |
| 3 | Итаконовая кислота. $CH_2$= C(COOH) – $CH_2$(COOH). Биосинтез связан с реакций цикла Кребса. | *Суммарное уравнение*  | | |
| | | Технологическая схема схожа со схемой получения лимонной кислоты. Ферментация осуществляется методом глубинного или поверхностного культивирования путем использования сахарозы, мелассы и гидролиза древисины | Грибы рода Aspergillus-terreus. | Для получения синтетического нитронного волокна |
| 4 | Кетокислоты (на примере α-кетоглутаровой кислоты, являющийся предшественником глутаминовой кислоты) | Непрерывная ферментация в среде, содержащей углероды и углеводороды (например, жидкий парафин) при 28–30 °С, pH 4,0–4,5, аэрация – 0,25 объемов воздуха на 1 объем среды в минуту. Продолжительность ферментации 6–7 суток. В конце процесса содержание кислоты равно 20 г/л, что соответствует 88 % от массы взятого парафина | Культуры Pseudomonas fluorescens, дрожжи Candida lipolituca C. rugoza | Биосинтез многих важных веществ на базе продуктов нефти |

По данным табл. 9.3 видно, что мицелиальные грибы являются хорошими продуцентами органических кислот. Из их

культур удалось выделить более 50 различных видов органических кислот.

В химических технологиях также широко применяются такие продукты жизнедеятельности микроорганизмов, как ферменты, ведь их действие более специфично по сравнению с химическими катализаторами. Так, протеазы в составе стирального порошка удаляют белковые загрязнения с волокон тканей, ферментативное расщепление крахмала сопровождается меньшим образованием побочных продуктов, чем при кислотном гидролизе.

В кожевенной промышленности коллагеназы и кеназы способствуют быстрому удалению из обрабатываемых шкур шерсти.

Производство технических ферментов контролируется «Правилами организации производств и контроля качества».

Ферменты, модифицированные методами генетической инженерии, чаще идут на производство моющих средств. Производство ферментов для различных отраслей промышленности за последние 10 лет выросло на 50 % и составило примерно 1,8 млрд. долл. США.

В качестве примера ниже кратко рассматриваются биотехнологии производства некоторых ферментов, используемых в химической промышленности [22, 154]:

1.*Сериновые протеиназы.*

Для сериновых протеаз и металлопротеаз продуцентами являются *Bacillus*,для кислых – грибы *Mucor*. При ферментации накопление протеаз происходит в конце логарифмической фазы роста микроорганизмов.

Сериновые протеазы входят в состав моющих средств.

2. *Грибной солод.*

Это технический ферментативный препарат, их продуценты – микроскопические плесневые грибы рода *Aspergillus*.

Пути ферментации:

1) культивирования плесневых грибов на твердой питательной среде с последующей сушкой и измельчением полученной массы;

2) экстракции «грибного солода» (сухие амилолитические ферменты) с последующим выпариванием и сушкой;

3) выделения из культуральной жидкости путем осаждения амилазы ацетоном и дальнейшим высушиванием коагулят при температуре 27–28 °С.

Предварительная ферментация осуществляется на средах из пшеничных отрубей вначале в колбах (30 °С в течение 3–4 сут. до стадии интенсивного образования спор), а затем – в кюветах в две стадии:

1) набухание и прорастание спор осуществляется 10–12 ч при температуре 32–33 °С и небольшой аэрации;

2) образование мицелиями амилазы при температуре 27–28 °С и усиленной аэрации.

3. Целлюлолитические ферментные препараты, их продуценты – грибы рода *Trichodermaviride*. Ферментация осуществляется с применением молочной сыворотки в течение 60-62 ч при температуре 29°С, pH 7,6-7,8.

***Липиды*** используются во многих отраслях промышленности для технических нужд, в том числе в животноводстве для производства микробного жмыха после их экстракции.

Липиды – это растворимые в неполярных растворителях клеточные компоненты микроорганизмов. Их концентрация составляет 75 % сухой биомассы. В состав липидов микроорганизмов входит сравнительно много ненасыщенных жирных кислот.

Продуцентами липид являются плесневый гриб *Penicillium soppil, Rhodotorulagracilis, Lipomyces lipoferus.*

Технология производства основана наиспользовании дешевого сырья (гидролизаты древесины или торфа, продукты нефти). Применяют аэробную ферментацию. На синтез 1 г липидов расходуется 6 г сахара. Соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот зависит от свойств продуцента, условий культивирования и от присутствия и соотношения в среде K, Mg, Na. Так, низкая температура стимулирует синтез ненасыщенных жирных кислот у грибов. Процесс длится 1–5 сут. , при этом в биомассе дрожжей образуется 50–60 % липидов. Из 1 т сухого торфа производят 40–50 кг липидов, которые по физико-химическим свойствам близки к растительным маслам.

**Развитие биотехнологии в строительстве** направлено на производство биоцидных бетонов и растворов, в производстве

модификаторов для строительных материалов и древесных композитов, а также в обработке сырьевых материалов. Биотехнологии обеспечивают производство строительных материалов, обладающих высоким качеством продукции и эффективным использованием сырья, экологическую безопасность продукции.

Для биоцидных бетонов и растворов разработана биоцидная добавка катапин – бактерицид, которая не только эффективно подавляет развитие плесневых грибов, но и не ухудшает строительно-технологические свойства цементных материалов [118, 178].

В целях улучшения однородности и качества глинистых материалов и повышения эффективности технологического процесса используют биопрепараты на основе силикатных бактерий *Bacillus mucilaginosus*. Биопрепарат разрушает силикаты и алюмосиликаты, в результате значительно улучшаются технические свойства глинистых минералов.

В производстве строительных материалов для улучшения их свойств широко используются различные модификаторы, в частности биологические поверхностно-активные вещества (Био-ПАВ). Они используются как пластификаторы, гидрофобизаторы, ускорители или замедлители твердения, а также как гидравлические добавки, пенообразователи и в других качествах.

Применяют пять классов БИО-ПАВ в качестве пластификаторов бетонов и растворов. На основе БИО-ПАВ производят эффективный пенообразователь для производства ячеистых бетонов.

Контрольные вопросы:

1. Какие перспективы стоят перед биотехнологией в промышленности по отраслям, особенности их развития?
2. Как развивается биотехнология в машиностроении?
3. Биотехнологическое производство биоэтанола и биодизеля, используемые для двигателей внутреннего сгорания.
4. Биотехнология в химической промышленности. Растворители лаков (1-бутанол, ацетон), применяемые при покраске автомобилей.
5. Биотехнология производства средств защиты от биоповреждений.
6. Биоповреждения: экотехнологическая проблема.

7. Эколого-технологическая концепция биоповреждения.

8. Классификация биоповреждений.

9. Требования и токсикологический контроль применения биоцидов.

10. Значение биотехнологии в нефтедобывающей, химической и нефтехимической отраслях промышленности.

11. Развитие методов биотехнологии в строительстве: основные направления и принципы их реализации.

# 10. БИОТЕХНОЛОГИЯ: СФЕРА «ЗЕЛЕНОЙ» ЗАЩИТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

## 10.1. Направления и задачи применения биотехнологии для охраны окружающей среды

Отрасль биотехнологии, направленная на решение экологических проблем по борьбе с загрязнениями окружающей среды, называется экологической биотехнологией (Экобиотехнология, Биотехнология в защите окружающей среды).

Применительно к охране окружающей природной среды биотехнология использует биологический резерв живой природы для включения их в антропогенные круговороты веществ, элементов и энергии.

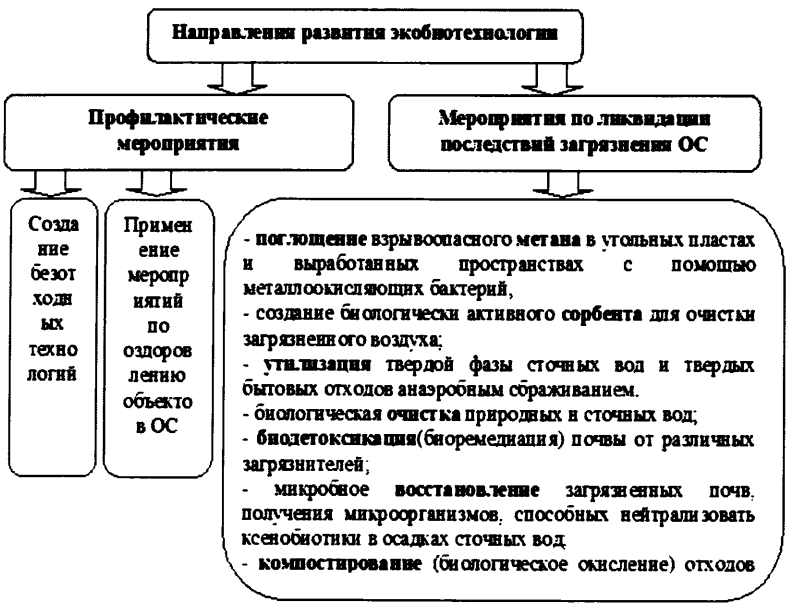



Рис. 10.1. Направления развития экобиотехнологии

В целом природоохранные мероприятия классифицированы на два основных направления:

1) мероприятия, проводимые с целью предотвращения негативных воздействий на окружающую среду;

2) мероприятия, направленные на ликвидацию последствий вредных воздействий.

Прежде предпочтение отдавалось более дешевым и эффективным мероприятиям второй группы, теперь же чаще применяются мероприятия первой группы.

На рис. 10.1 показаны некоторые биотехнологические приемы защиты компонентов биосферы: атмосферы, гидросферы, литосферы.

В табл. 0.1 рассматриваются задачи, решаемые экобиотехнологией.

Таблица 10.1

Задачи, решаемые экобиотехнологией

| № п/п | Задача | Подзадача | Мероприятие |
|---|---|---|---|
| 1 | Очистка стоков | Детоксикация биомассы или разрушение в ней вредных для окружающей среды соединений (токсины, неорганические, органические и комплексные соединения) | Использование биоочистных сооружений |
| | | Биологический метод удаления тяжелых металлов | Получение штаммов |
| | | Элиминация анионов, превосходящие допустимые концентрации (фосфаты, нитраты) | Использование Био-ПАВ |
| 2 | Переработка твердых отходов | Соблюдение инженерно-конструкторских, технологическихи санитарных норм размещения твердых отходов на полигонах | Оптимизация управления и работы геобиореакторов |

продолжение табл. 10.1

| № п/п | Задача | Подзадача | Мероприятие |
|---|---|---|---|
| 3 | Охрана почв и земель | Борьба с аккумулятивным загрязнением во времени земель свалками, помойками и отвалами, пестицидами, нефтезагрязнениями | Биоремедиация в комплексе с другими физико-химическими методами очистки |
| | | Борьба с ксенобиотиками, ремедиация техногенно загрязненных почв | |
| 4 | Охрана атмосферного воздуха | Борьба с дурно пахнущими (органическими) загрязнениями воздуха | Разработка конструкторско-технологических решений по созданию биофильтров |
| | | Очистка выбросов от различных загрязнителей | |

Как видно из табл. 10.1, прикладные аспекты экобиотехнологии основаны на применении методологии промышленной биотехнологии и биотехнологии микроорганизмов.

В табл. 10.2 охарактеризованы предпосылки для внедрения методов биотехнологии в экологию и охрану окружающей среды.

Таблица 10.2

Предпосылки для внедрения методов биотехнологии в экологию и охрану окружающей среды

| Предпосылка | Особенность | Экологические последствия |
|---|---|---|
| Развитие промышленности | промышленность, как основной сектор экономики на сегодня развивается быстрыми темпами | с одной стороны, рост благосостояния, с другой – выработка большого объема отходов, сточных вод и выбросов |
| Биохимическая *«гибкость»* микроорганизмов | Каталитическая способность микроорганизмов | Биологические технологии являются экологически чистыми и развиваются благодаря новым достижениям науки |

продолжение табл.10.2

| Предпосылка | Особенность | Экологические последствия |
|---|---|---|
| | *«Микробиологическая память»* | При повторном попадании определенного соединения в окружающую среду период деградации сокращается |
| Развитие молекулярной биотехнологии | Возможность использования сконструированных генотипов для борьбы с загрязнениями окружающей среды | Используют «катаболические плазмиды», которые кодируют реакцию (или многоэтапную последовательность реакций), приводящую к трансформации или минерализации субстрата. Ограничение: по сравнению с ними исходная природная популяция, хорошо адаптированная к окружающей среде, более конкурентоспособна |

Как видно из табл. 10.2, основными предпосылками для внедрения методов биотехнологии в экологию являются развитие промышленности и биологии.

Из вышеизложенного следует, что современные представления о физиологических, биохимических и генетических взаимоотношениях между компонентами сообщества микроорганизмов пока недостаточны для полного раскрытия возможностей биотехнологии в борьбе с загрязнениями.

## 10.2. Биодеградация ксенобиотиков

*Биодеградация* (биоразрушение) – это многоступенчатое преобразование сложных веществ на более простые соединения благодаря разнообразию ферментативных систем и большой лабильности метаболизма микроорганизмов.

Именно биологическая активность микроорганизмов, такие как *трансформация* (незначительное изменение сложных молекул), *фрагментация* (разложение сложных молекул до простых

соединений) и *минерализация* (превращение в воду, углекислый газ, водород, метан и пр.) позволяют предотвращать накопление химических загрязнителей антропогенного происхождения.

Ксенобиотики – это чужеродные соединения, не разрушающиеся в природе в обычных условиях (синтетические полимеры, красители, пестициды, фармацевтические препараты и т. д.), обладающие уникальной биологической активностью, устойчивостью и стабильностью и требующие столетия для полного разложения при обычных условиях. Они не включаются в элементные циклы углерода, азота, серы или фосфора, имеют аккумулятивный характер накопления и проявляют мутагенную, канцерогенную, аллергенную и тератогенную активности.

На скорость деградации ксенобиотиков влияют её химическая структура, тип почвы, минеральный и органический состав почвы, влажность, содержание кислорода и температура.

Попадая в окружающую среду, ксенобиотик может быть подвергнут полной минерализации, частичной деградации, накоплению или полимеризации (рис. 10.2).

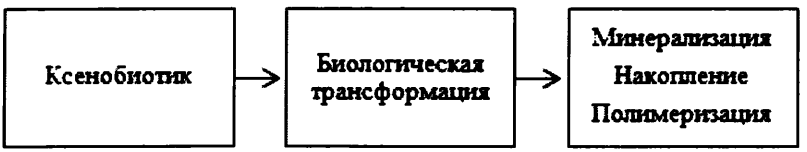



Рис. 10.2. Судьба ксенобиотиков в окружающей среде

Как следует из рис. 10.2, в природе судьба ксенобиотика вследствие консорциумного микробиологического воздействия имеет многоступенчатый период деградации.

Биодеградация ксенобиотиков осуществляется бактериями и грибами, наиболее яркими представителями которых, являются:

– среди бактерий: грамотрицательные – *Pseudomonas, Sphingomonas, Burkholderia, Alcaligenes, Acinetobacter, Flavobacterium,* метаноокисляющие и нитрифицирующие бактерии, грамположительные – *Arthrobacter, Nocardia, Rhodococcus* и *Bacillus;*

– среди грибов: *Phanerochaete, Penicillium, Aspergillus, Trichoderma, Fusarium.*

На данное время нет общепринятых критериев, позволяющих прогнозировать судьбу того или иного ксенобиотика в природе.

На способности микроорганизмов к разложению сложных органических веществ основан процесс ***биоремедиации***, т.е. устранения загрязняющих агентов из окружающей среды посредством биологической активности. Биоремедиацию осуществляют путем либо стимулирования развития активных микроорганизмов, уже имеющихся в окружающей среде, либо – интродуцированием в загрязненную область микроорганизмов с уже известной деструктивной активностью.

### 10.3. Биотехнология защиты атмосферы

Основными загрязнителями воздушного бассейна являются предприятия пищевой, нефтеперерабатывающей и химической промышленности, а также полигоны ТБО, отстойники сточных вод и, конечно же, животноводческие комплексы. Основные загрязнители воздуха – это органические (ароматические и непредельные углеводороды, азот-, серо- и галогенсодержание соединения), неорганические (аммиак, хлорводород, сероуглерод, сернистый газ, окислы углероды и др.), и дурнопахнущие (сероводород, аммиак и др.) вещества.

Согласно И. Б. Уткина, 1989 г., в биотехнологии очистки воздуха используют три типа установок – это биоскруберы, биофильтры, биореакторы с омываемым слоем (табл. 10.3).

Таблица 10.3

Типы установок для биоочистки атмосферы

| Показатель | Типы установок для биоочистки воздуха | |
|---|---|---|
| | Биофильтр | Биореактор с омываемым слоем |
| Рабочее тело | Фильтр – иммобилизация микроорганизмов на носителях | Иммобилизация микроорганизмов на носителях |
| Циркуляция воды | Отсутствует | Имеется |

продолжение табл.10.3

| Показатель | Типы установок для биоочистки воздуха | |
|---|---|---|
| | Биофильтр | Биореактор с омываемым слоем |
| Основная стадия удаления примесей из воздуха | Десорбция фильтром, микробная деструкция | Диффузия через водную пленку к микроорганизмам. Деструкция в биослое |
| Источник минеральных солей | Материал фильтрующего слоя | Минеральные соли вносят в воду |
| Основное преимущество | Простата конструкции, малая энергоемкость | Консорциумный метод очистки большого спектра загрязнителей |
| Основной недостаток | Низкая объемная скорость потока, невозможность контроля процесса | Низкая скорость биохимических реакций, специфичность штаммов |

Из табл. 10.3 следует, что на сегодня наиболее широко практикуемой технологией является биотехнология производства биофильтров. При прохождении загрязненного воздуха через такие биофильтры, происходит деградация плохо растворимых в воде веществ, тогда как растворимые соединения разрушаются в капельных биофильтрах.

Применение биофильтров: от неприятного запаха (табл. 10.4) для отработанных газов литейных производств, крупных животноводческих хозяйств, также биофильтры находят применение при очистке стоков и почв.

Конструкция биофильтра проста в сборе и обслуживании. Носителем служит компост, кора, торф, шлак или другие материалы с развитой поверхностью и пористостью.

Микроорганизмы, сосредоточенные в носителях окисляют загрязняющие вещества при пропускании отработанного воздуха. Конструкция биофильтров позволяет проводить замены носителей, что повышает эксплуатационные возможности биофильтров.

В зависимости от формы различают плоские и многоярусные биофильтры (рис. 10.3).

Таблица 10.4

Применение биофильтров в зависимости от загрязняющих веществ [123]

| Очистка | Компонент | Источник |
|---|---|---|
| Биофильтр капельный | $H_2S$ | Метантенки |
| | Фенол, амины, кетоны, альдегиды | Литейное производство |
| | Низшие жирные кислоты | Мясокомбинат |
| | Аммиак, альдегиды, толуол | Химические заводы |
| Биофильтр | Низшие жирные кислоты, аммиак | Животноводство |
| | Фенол | Промышленные отходы |

Как видно из рис. 10.3, использование биофильтров позволяет выполнять две функции – очистку воздуха от взвешенных частиц и загрязняющих веществ, очистку воздуха от неприятных запахов. Биофильтры способны снижать содержание различных загрязнителей в пропускаемом воздухе до 95 %.

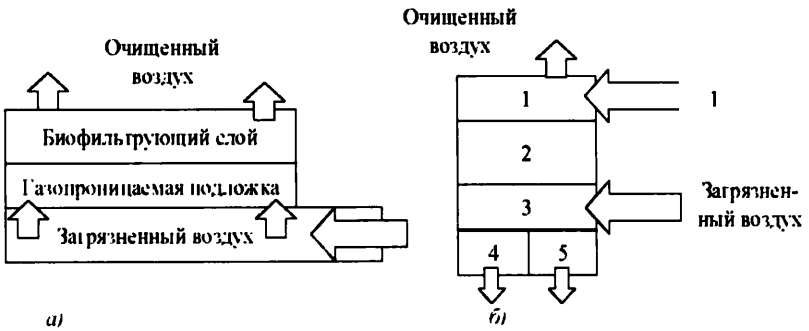



Рис. 10.3. Блок-схема конструкционного решения и технологического принципа работы биофильтра:

*а) биофильтр плоский (при увеличении слоев образуется многоярусный биофильтр); б) биофильтр капельный; 1 – регулируемая подача питательной среды и щелочи; 2 – биофильтр с микроорганизмами; 3 – вентилятор, удаление чистой воды; 5 – удаление стоков*

## 10.4. Биотехнология защиты гидросферы

Известно, что 87 % (510 млн. км$^2$) поверхности Земли представлена водой. Несмотря на внушительный объем вод, на нашей планете только 2,5 % приходится на долю пресной воды.

Гидросфера – это природный фильтр-аккумулятор загрязняющих веществ, поступающих в окружающую среду, что связано с циклом глобального круговорота воды и с её универсальной способностью к растворению газов и минеральных веществ. По мере развития цивилизации потребность воды возросло с 10л/сут (человек каменного века) до 700 л/сут. При этом на питье и приготовление пищи человек затрачивает 10 % потребляемой воды, на бытовые нужды 35–43 %. Производство сточных вод на душу городского населения достигает в настоящее время 500 л в год.

Среди отраслей экономики по потреблению воды первое место занимает:

– сельское хозяйство (для получения 1 т пшеницы необходимо 1500 т воды, 1 т риса – 7 000 т);

– второе – промышленность (для получения 1 т угля затрачивается 2 т, стали – 15–20 т, целлюлозы – 40–500 т воды);

– третье – коммунальное хозяйство городов.

Воды, отфильтрованные от крупных частиц и песка и подвергнутые отстаиванию относят к *сточным*. Сточные воды после отстаивания обычно содержат 20–35 % взвешенных твердых частиц, 45–50 % органических веществ, 35–40 % – азотсодержащие соединения (соединения аммония, нитраты, фосфаты), 10 % – жиры и детергенты, 5 % – полимерные и полициклические соединения. Общее состояние сточных вод определяют по органолептическим (запах, цвет и др.), физико-химическим и биологическим показателям.

Сточные воды подразделяют на *технологические* (стоки различных предприятий), *хозяйственно-бытовые* и *поверхностные* (дождевые и снеговые воды). Наибольшее число стоков, загрязняющие поверхностные и грунтовые воды, образуется в энергетике, сельском и коммунальном хозяйствах.

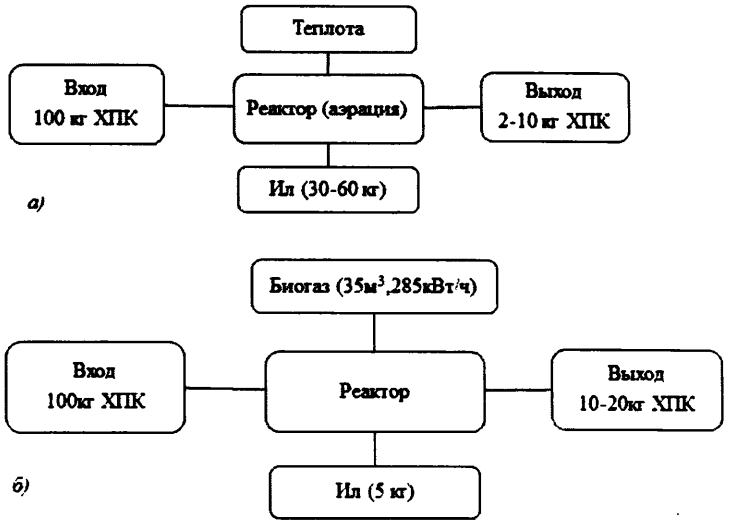



Рис. 10.4. Упрощённая блок-схема по очистке сточных вод в сравнительном аспекте: аэробный и анаэробный
*а) аэробный процесс очистки сточных вод; б) анаэробный процесс очистки сточных вод*

При очистке сточных вод содержащиеся в ней загрязнители должны быть полностью удалены.

По существующим нормам содержание органических веществ в очищенной воде не должно превышать 10 мг/л.

Для проведения мероприятий, направленных на очистку сточных вод, выбора методов очистки и доочистки следует провести детальный анализ состава сточной воды с выяснением концентраций тех или иных соединений, с определением количественного и качественного состава загрязнений.

Для очистки сточных вод методами биотехнологии применяют два способа:

- аэробный, при котором микроорганизмы используют растворенный в водс кислород (рис. 10.4; а) и
- анаэробный, где микроорганизмы используют углерод, входящий в состав органических молекул (рис. 10.4; б).

Каждый из этих процессов имеет свои преимущества и недостатки, основные из которых представлены в табл. 10.5.

Таблица 10.5

Биотехнологические процессы очистки сточных вод

| № п/п | Показатель | Процесс | |
|---|---|---|---|
| | | Аэробный | Анаэробный |
| 1 | Применяется при ХПК, мг/л | Не выше 2000 | Выше 2000 |
| 2 | В качестве акцепторов электронов | Микроорганизмы используют кислород, растворенный в воде | Микроорганизмы используют углерод, входящий в состав органических молекул |
| 3 | Биореактор | Аэротенк, биофильтр | Метантенк, септиктенк |
| 4 | Преимущества | 1. Глубокая очистка<br>2. Высокая скорость и использование веществ в низких концентрациях<br>3. Дешевизна | 1. Мало образуется биомассы: 0,1–0,2 кг на каждый удаленный кг БПК<br>2. Образует метан<br>3. Малая затрата энергии на перемешивание |
| 5 | Недостатки | 1. Необходимость отчуждения довольно больших площадей.<br>2. Образование большого количества избыточного ила (микробной биомассы – 1–1,5 кг на каждый удаленный кг БПК .<br>3. Образование устойчивой пены в аэротенках. Заиливание, дурной запах и массовое размножение мух в биофильтрах | 1. Замедленная скорость реакции.<br>2. Невозможность удаления органических загрязнений в низких концентрациях.<br>3. Недостаток фундаментальных научных знаний |

### *10.4.1. Аэробный способ очистки сточных вод*

Различают экстенсивные биологические и интенсивные биотехнологические методы очистки сточных вод (рис. 10.5).

К дополнению к рис. 10.5 следует отметить, что при биотехнологии очистки стоков используемые вращающиеся диски на половину погружаются в медленно протекающую воду. При этом вода, поступающая сверху, медленно струится между обросшим микробной биопленкой (сложное микробное сообщество) наполнителем и собирается внизу.

Низкая плотность консорциума микроорганизмов, способных очищать загрязнения органической природы – это лимитирующий фактор при самоочищении природных водоемов и при функционировании окислительных прудов.

Данное ограничение устраняется в первом случае системой принудительной аэрации, во втором – путем поддержания высокой плотности микробной популяции в реакторах через возврат части активного микробного ила.




Рис. 10.5. Биотехнология очистки сточных вод

Данная технология применяется во всем мире для очистки городских сточных вод. Интенсивные методы основаны на использовании активного ила (табл. 10.6).

Таблица 10.6

Природа, состав и свойства активного ила

| Природа | Упрощенный состав | Основные свойства |
|---|---|---|
| темно-коричневые хлопья размером до нескольких сотен микрометров | 70 % живые организмы, 30 % твердые частицы неорганической природы | функционируют благодаря согласованному метаболизму |
| микробиологическое сообщество микроорганизмов, представленная бактериями, водорослями и простейшими | | имеют поверхность с сильно адсорбционной способностью |
| | | способны образовывать стабильные флоккулы размером до 2 мм |

В дополнение к табл. 10.6 следует отметить, что благодаря первым двум свойствам активный ил деградирует загрязнения, третьему – осуществляет осаждение.

### *10.4.2. Анаэробный способ очистки сточных вод*

Анаэробный способ очистки сточных вод применяют для стоков, ХПК которых превышает 2000 мг/л. Метод позволяет удалить до 90 % загрязнений.

При очистке стоков практикуемым анаэробным процессом является сбраживание илом. Анаэробное сбраживание ила используется для улучшения качества удаляемого ила: уменьшения его массы и количества патогенной микрофлоры в нем. Процесс очистки анаэробным способом проходит обычно в мезофильных условиях при 30–38 °С.

В табл. 10.7 и на рис. 10.6 дана характеристика и схема микробиологии анаэробной очистки стоков.

Таблица 10.7

Микробиология анаэробной очистки сточных вод

| Класс | Бактерии | Состав клеток на 1 мл ила | Характеристика |
|---|---|---|---|
| 1 | Гидролитические | Облигатными и факультативными анаэробами численностью $10^5$–$10^9$ клеток на 1 мл сбраживаемого ила | Гидролиз субстрата до низкомолекулярных органических кислот (уксусная, пропионовая, муравьиная и др.) и других малых молекул (спирты и кетоны; газы – водород, метан, диоксид углерода) |
| 2 | Гетероацетогенные | грамм-отрицательными и нефототрофными бактериями численностью 4,2 х $10^6$ клеток на 1 мл сырого ила | Производят уксусную кислоту и водород |
| 3 | Метаногенные | хемолитотрофными, и ацетрофными бактериями численностью $10^6$–$10^8$ клеток на 1 мл сырого ила | Первые превращают $H_2$ и $CO_2$ в $CH_4$ (используют водород), вторые – перерабатывают уксусную и муравьиную кислоту, метанол и метиламины в $CH_4$ |

Как видим из табл. 10.7, в процессе смешанной ферментации анаэробного сбраживания состав микробной популяции по своим пищевым потребностям может быть разделен на три класса.

Из рис. 10.6 следует, что при анаэробной ферментации примерно 70–75 % метана образуется из уксусной кислоты и 25–30 % синтезируется автотрофно при потреблении $C_1$-соединений.

Анаэробная биодеградация обеспечивается эксплуатацией реакторов двух типов:

1. Реакторы с флоккулированной биомассой (септиктенки), которые могут быть сопоставлены со станциями аэрации, работающих на активном иле.

Септиктенки – отстойники, в которых осевший ил подвергается анаэробной биодеградации. Они эксплуатируются с большим временем пребывания (больше 20 сут.) сточных вод при температуре 34–38 °С. Биомасса остается в системе приблизительно в течение 50 суток. Применяют для очистки биологических загрязнений сточных вод пищевой промышленности.

2. Реакторы с неподвижной биопленкой, сопоставимые с капельными аэробными биофильтрами.

Они представляют собой простой биофильтр с восходящим током жидкости для очистки стоков. Особенностью является то, что биофильтр для устранения заиливания имеет крупную насадку.

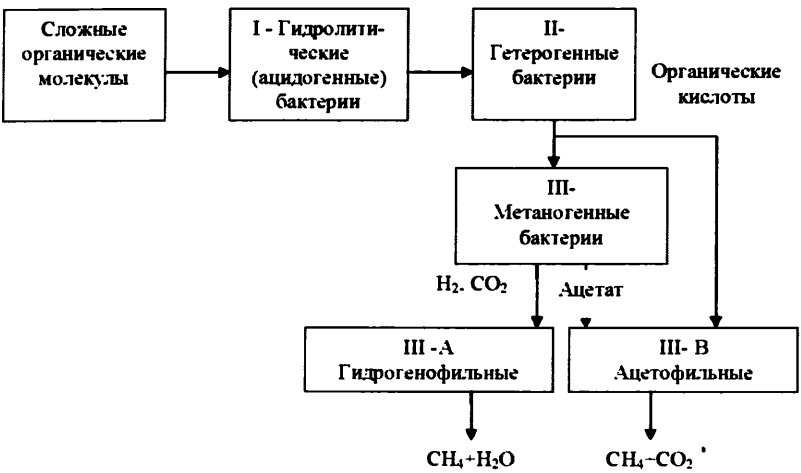



Рис. 10.6. Пути биодеградации субстрата при анаэробном сбраживании

Анаэробные биофильтры используются для очистки подогретых сточных вод с умеренными концентрациями органических веществ БПК 5 000 мг/л, низкими концентрациями взвешенных частиц. В данном случае используют реакторы двух типов: со стационарным нисходящим потоком и с расширяющимся и псевдоожиженным слоем (рис. 10.7).

Как видно из рис. 10.7, установки включают первичный тенк, содержимое которого полностью перемешивается рециркуляцией биогаза или ила, механической мешалкой.

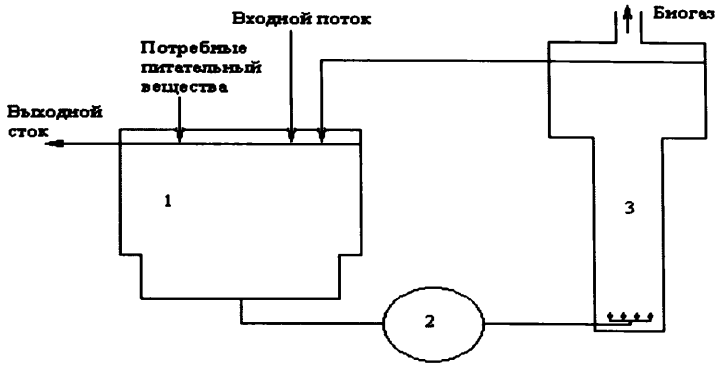



Рис. 10.7.Схема сбраживателя с псевдоожиженным слоем:
*1 – рециркуляционный контактный реактор; 2 – насос;*
*3 – сбраживатель с псевдоожиженным слоем песчаной насадки*

Биомасса в анаэробном реакторе удерживается благодаря образованию легко оседающих бактериальных флоккул в виде гранул диаметром 2–5мм. Образование гранулированного ила зависит от микробиологических и биохимических факторов, характеристик субстрата и условий в реакторе.

Основу структуры метаногенных гранул составляют археи родов *Methanosarcina*и *Methanosaeta.* Первые формируют рыхлые, вторые – плотные гранулы, в которые погружены клетки и колонии других бактерий, входящие в сообщество. В таких реакторах плотный трудно перерабатываемый слой загрязнений находится у дна реактора, а над ним взвешенный слой гранулированного ила, над которым расположены менее плотный слой флоккул и жидкая фаза. Биогаз собирается в верхней части обоих реакторов.

Данная система имеет следующие преимущества перед другими реакторами, работающими с высокой нагрузкой:

1) вымывание биомассы минимально благодаря ее адгезии к твердым частицам носителя;

2) использование маленьких плотных частиц обеспечивает очень большую удельную поверхность;

3) образуется тонкая плотная биопленка, содержащая в основном активную биомассу;

4) удаление почти всей быстро разрушаемой растворимой БПК/ХПК обеспечивает удаление в среднем от 70 до 90 % общей БПК/ХПК;

5) достигаются большие объемные нагрузки по ХПК – порядка 10–40 кг/(м$^3$·сут.) (обычно проектная нагрузка по ХПК составляет около 16 кг/(м$^3$·сут.);

6) время пребывания жидкости в аппарате может быть невелико, что повышает его рентабельность.

Основные недостатки использования реакторов с расширяющимся и псевдоожиженным слоем:

1) требуют инженерного обеспечения;

2) необходима дополнительная энергия для образования псевдоожиженного слоя.

Требования, предъявляемые к процессу, следующие: pH должен быть в пределах 7,0–7,2; температура не должна превышать 36–37 °С; нагрузка по субстрату должна увеличиваться постепенно примерно на 0,5кг БПК/(м$^3$·сут). Для определения эффективности процесса отношение концентраций метана и диоксида углерода в биогазе контролируют.

После анаэробной очистки для окисления органических веществ, аммония и сульфида применяют дополнительно и аэробное окисление.

Для полужидких текучих отходов с содержанием сухого вещества до 15 г/л (осадки сточных вод, навоз) пригодна только анаэробная обработка в метантеках, которые представляют собой емкости (от 0,1 м$^3$ до 20 тыс. м$^3$), сбраживающие в периодических режимах при 30–55 °С длительностью до 2–3 недель. Образуемый при этом биогаз содержит не менее 50 % метана.

Анаэробные процессы очистки сточных вод имеют ряд очевидных преимуществ перед аэробными биологическими процессами. Главное преимущество заключается в высокой степени превращения углерода органических веществ, содержащихся во входном потоке, в метан и диоксид углерода. Это уменьшение количества углерода сопровождается уменьшением энергии, которую бактериальная популяция тратит на образование биомассы, и, следовательно, количество удаляемого избыточного ила меньше, чем в аэробном процессе биоочистки. Кроме того,

дополнительно образуется биогаз, представляющий собой весьма ценное топливо.

### *10.4.3. Сырой активный ил*

При биотехнологическом методе очистки сточных вод за счет биологического окисления углеродсодержащих компонентов образуется прирост биомассы. Следует отметить, что от всех затрат, направленных на утилизацию сточных вод, на переработку и ликвидацию образовавшегося ила расходуется до 30–40%.

Сырой активный ил по природе и степени переработке классифицируют на следующие классы:

1. Первичный – образуется в первичном отстойнике, содержит смесь сырых твердых частиц. Концентрация достигает 7 %.

2. Вторичный – образуется в реакторе и, в свою очередь, классифицируется на гуммированный (образуется в капельных биофильтрах на поверхности пористой насадки и реакторах с неподвижной биопленкой в виде пленки. Концентрация не превышает 2–3 %) и флоккулированный (образуется в процессах с активным илом. Концентрация 8–12 г/л.).

Технологический процесс утилизации ила зависит от его типа и определяется способом его ликвидации и местом его переработки. Технические методы переработки ила сводятся к выполнению таких процессов, как обезвоживание, сбраживание и ликвидация.

*Обезвоживание ила* достигается отстаиванием или фильтрованием. В первом случае различают первичное и вторичное отстаивание.

Первичное отстаивание применяется непосредственно после сброса сточных вод, т.е. в первичном отстойнике. В данном случае концентрирование ила достигается за счет давления верхнего слоя осадка, выжимающего воду из слоя твердых частиц.

Вторичное отстаивание применяется для ила, прошедшего стадию анаэробного сбраживания. Данный процесс предусматривает проведение подготовительных операций, направленных на удаление микропузырьков биогаза путем быстрого охлаждения, вакуумного дегазирования и аэрации.

Во втором случае процесс обеспечивает получение осадка с высоким до 75 % содержанием твердых компонентов.

Данную технологию осуществляют на фильтровальных, мембранных, ленточных или вакуумных прессах.

С целью улучшения фильтруемости необходимо осуществить модификацию свойств или путем предварительной обработки ила добавлением химических реактивов (неорганические соли – известь, хлорид железа и др., органические полимеры).

После обезвоживания сырой ил подвергают *сбраживанию* – анаэробному (с помощью метаногенных бактерий) или аэробному (с помощью гидролитических и ацидогенных бактерий (рис. 10.8).

При этом до 70 % метана образуется из метильной группы ацетата с помощью ацетофильных метаногенных бактерий и до 30 % – из водорода и диоксида углерода с помощью гидрогенофильных бактерий.

К основным контролируемым параметрам относятся при анаэробном сбраживании потребление жирных кислот (200–500 мг/л), гидрокарбонатная щелочность (3500–5 000 мг/л) и pH (7–7,5), при аэробном – подача энергии (0,7–4,4 кВт/кг окисленной ЛФ), скорость подачи кислорода к илу (<1,5мш $O_2$/г ЛФ·ч), БПК ила (<0,2 кг БПК/кг ЛФ) и распространение запахов от ила при хранении при 25 °С. Полученный при сбраживании ила газ содержит 65–70 % метана и его общая теплота сгорания соответствует 22–24 МДж/м$^3$. Анаэробное сбраживание ила следует применять при малых, аэробный – при больших объемах (более 50 тыс. населения).

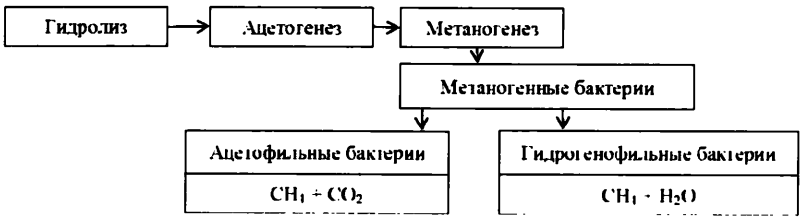



Рис. 10.8. Схема метаболического пути биодеградации полимеров до метана

После сбраживания ил *ликвидируют* путем захоронения на полигонах ТБО или сжигания (используют только сырой ил). Также приемлем рециклинг ила в качестве удобрения в сельском хозяйстве.

Сброженный ил содержит азота 5,1, фосфора 1,6 и калия 0,4 % от сухого вещества, доступность которых для сельскохозяйственных культур составляет 50–85 % для азота, 20–100 % для фосфора.

Применение ила в качестве удобрения возможно только после его обеззараживания.

## 10.5. Биотехнология защиты литосферы

### *10.5.1. Биотехнология очистки и восстановления почв*

Почва как динамически развивающая сложная система представляет собой, с точки зрения биотехнологии, *«природный тонкослойный ленточный биореактор»* (толщина почвенного покрова Земли не превышает 1–1,5 м), где протекают важнейшие для биосферы биохимические реакции [43].

*«Население»* почв внушительно: на площади 1 га в верхнем 30-сантиметровом слое почвы сосредоточено до 25 т живых организмов, из них 20 т – микроорганизмы, 4 т – земляные черви и 1 т – другие обитатели.

Такая *«жизненная насыщенность»* придает почве важную биотехнологическую функцию: почва является средой для производства биомассы, так как живая фаза почвы иммобилизована на твердой фазе, а газовая и жидкая фазы способствуют ферментационным реакциям.

Благодаря этой особенности почва является фильтром (не пропускает загрязнения в грунтовые воды), буферной средой (среда для трансформации химических соединений), биорезервуаром (среда для проживания живых организмов) и сырьевым материалом (содержит питательные вещества).

В табл. 10.8 дана краткая характеристика типам почвенных повреждений.

Как видно из табл. 10.8, типы загрязнения почв имеют широкий спектр.

Таблица 10.8

Типы почвенных повреждений

| Типы почвенных повреждений | Причина | Характеристика краткая |
|---|---|---|
| Эрозия почвы | Удаление почвенного покрова водой или ветром | Процесс активен в местах, где земля используется сверхинтенсивно |
| Закисление почвы | Естественные процессы (диссоциация карбоновых кислот совместно с вымыванием оснований из почвы атмосферными осадками), землепользование (удаление из почвы основных катионов с урожаем), избыточное применение азотных удобрений, атмосферные осадки ($SO_2$, $NO_x$, $NH_3$) и др. | Усилен выбросами в атмосферу соединений серы и азота, образуемых при сжигании минеральных топлив и выделяемых в промышленных процессах |
| Загрязнение тяжелыми металлами | Предприятия металлургии, тепловые станции, химические предприятия, отходы | Аккумулируются в почве, загрязняют пищевые цепочки, влияют на качество воды |
| Загрязнение почвы органическими загрязнителями | Удобрения, отходы производства и потребления | Сложную проблему пораждают стойкие органические загрязнители |
| Загрязнение почв искусственными радионуклеотидами | Загрязнения от испытаний ядерного оружия, ядерных катастроф и взрывов | Опасные изотопы: Cs-137б Sr-90, Pu |

Классификация технологий восстановления почв представлены на рис. 10.9.

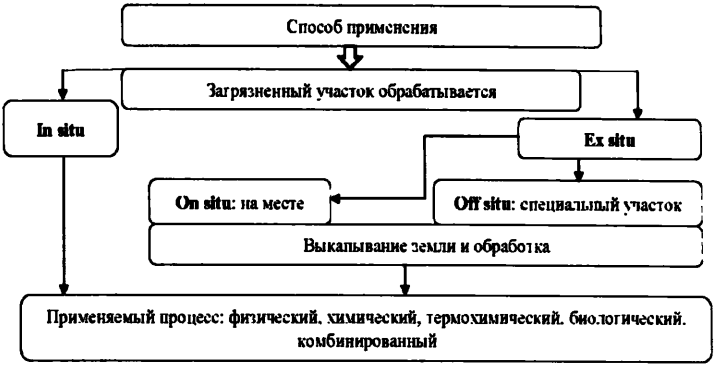



Рис. 10.9. Классификация технологий восстановления почв

Сущность биотехнологии восстановления почв дана в табл. 10.9.

Таблица 10.9

Характеристика технологий восстановления почв

| Особенности | Преимущества | Ограничения | Виды |
|---|---|---|---|
| 1) ключом к биоразложению загрязнений является метаболическая активность микроорганизмов;<br>2) биоразложение завершается полной минерализацией или частичным разложением как в аэробных, так и в анаэробных условиях;<br>3) | 1) биологическому разложению поддаются очень многие органические соединения;<br>2) биологические процессы применимы во всех средах;<br>3) в таких процессах образуется мало или вообще не образуются остаточные соединения; | – обычно неприменимы к неорганическим загрязнениям;<br>– являются медленной загрязненной почвы;<br>– требуют очень подробного описания (изучения) участка;<br>– ограничены особенностями участка | 1) бионасыпи *(ex);*<br>2) биовосстановление в жидкой фазе с образованием биовзвеси (bioslurry) *(ex);*<br>*3)* биовентилирование *(in);*<br>4) компостирование *(ex);*<br>5) усиленное биовосстановление *(in);*<br>6) биовосстановление в твердой фазе - обработка загрязненной почвы (ила) с участием поверхности здоровой почвы на выделенном участке (landfar- |

продолжение табл. 10.9

| Особенности | Преимущества | Ограничения | Виды |
|---|---|---|---|
| 3) чтобы ускорить биоразложение, прибегают к стимулированию природных микроорганизмов | 4) биопроцессы позволяют проявлять гибкость при проектировании системы;<br>5) стоимость биопроцессов меньше стоимости других технологий | | ming) *(ex);*<br>7) отслеживаемое *естественное* ослабление загрязнения (его рассеяние и разложение) *(in);*<br>8) фитовосстановление *(in)* |

В табл. 10.10 раскрывается характеристика биотехнологии очистки почвы.

Таблица 10.10

Характеристика биотехнологии очистки почвы
(Д. Ю. Ступин, 2009)

| Биотехнологии | Целевые загрязнения | Продолжительность очистки к стандартной массе отхода в 20 000 т |
|---|---|---|
| Бионасыпи *(ex)* | ПЛОС, ЛОС, Х-ПЛОС, Х-ЛОС, ПАУ | < 6 мес. |
| Биовосстановление в жидкой фазе – биовзвесь *(ex)* | ПЛОС, ЛОС, Х-ПЛОС, Х-ЛОС, ПАУ, Диокс./Фур., Пест. | 6–12 мес. |
| Биовентилирование *(in)* | ПЛОС, ЛОС, Х-ПЛОС, Х-ЛОС, ПАУ | < 6 мес. |
| Компостирование *(ex)* | ПЛОС, ЛОС | 6–12 мес. или более |
| Усиленное биовосстановление *(in)* | ПЛОС, ЛОС, Пест. | 6–12 мес. |

продолжение табл. 10.10

| Биотехнологии | Целевые загрязнения | Продолжительность очистки к стандартной массе отхода в 20 000 т |
|---|---|---|
| Биовосстановление в твердой фазе – обработка с участием верхнего слоя почвы *(ex)* | ПЛОС, ЛОС, Х-ПЛОС, Х-ЛОС, ПАУ, Пест. | > 12 мес. |
| Отслеживаемое естественное затухание загрязнения *(in)* | ПЛОС, ЛОС | > 12 мес. |
| Фитовосстановление *(in)* | ПЛОС, ЛОС, неорганические вещества, ТМ | > 12 мес. |
| Обозначения: ЛОС – летучие органические соединения; ПЛОС – полулетучие органические соединения; Х-ЛОС – галогенированные летучие органические соединения; Х-ПЛОС – галогенированные полулетучие органические соединения; ПХБ – полихлорированные бифенилы; Диокс./Фур. – диокси ны/фураны; ПАУ – полиароматические углеводороды; Пест. – пестициды; ТМ – тяжелые металлы | | |

Биотехнология является наиболее распространеным подходом при очистке и восстановлении почв. Основная цель применяемой биотехнологии – это стимулирование микробиологической активности с использованием загрязнителей в качестве источника пищи и энергии.

### *10.5.2. Принципы биотехнологии переработки отходов*

Органические отходы подразделяются по источнику на промышленные, сельскохозяйственные и бытовые; по физическому состоянию на твердые (твердых бытовые и минеральные отходы), полужидкие (навоз, осадки сточных вод) и жидкие (сточные воды).

В экобиотехнологии под обработкой отходов подразумевают биологическое разложение органических соединений. Деградация органических веществ осуществляется микроорганизмами, как в аэробных, так и анаэробных условиях (табл. 10.11).

По мере исчерпания невозобновляемых ресурсов упор делается на исследования в области рециклинга, т.е. повторного

использования отходов. Это связано, прежде всего, с тем, что из отходов образуется в больших количествах ценный источник:

– биоэнергии (метан) – из отходов органической природы (ТБО, отходы растительного и животного происхождения);

– редкоземельных и благородных металлов – из золошлаковых отходов.

Таблица 10.11

Аэробная и анаэробная деградация органических веществ в сравнительном аспекте

| № | Показатель | Технология деградации | |
|---|---|---|---|
| | | в аэробных условиях | в анаэробных условиях |
| 1 | Энергетический баланс суммарных реакций | $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6\ H_2O$ + микробная биомасса + теплота | $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_4 + 2CO_2$ + микробная биомасса + теплота |
| 2 | Затраты энергии при деградации глюкозы | 59 % энергии расходуется на прирост биомассы и 41% составляют тепловые потери | 8 % энергии расходуется на прирост биомассы, 3 % – тепловые потери и 89 % переходит на метан |
| 3 | Процесс | большинство органических веществ окисляется микроорганизмами независимо друг от друга, но в то же время присутствует соокисление (кометаболизм) | метаногенез осуществляется многоступенчато при участии четырех групп микроорганизмов: гидролитиков, бродильщиков, ацетогенов и метаногенов |

*Твердые отходы* – это остатки продукций, утратившие свои потребительские свойства в процессе человеческой жизнедеятельности. В среднем на каждого жителя образуется не менее 10–20т различных твердых отходов в год. Производство твердых бытовых отходов на душу городского населения достигает в настоящее время от 300 (СНГ) до 650 (США) кг/год.

Твердые отходы делят на отходы производства (твердые минеральные отходов – ТМО) и потребления (твердые бытовые отходы – ТБО). Часть ТБО представлена инертными материалами, стеклом, металлом, пластиком, но более половины – органикой (пищевые отходы до 22–27 %, бумага до 38–43 %). Кроме того, твердые отхо-

ды образуются после очистки сточных вод и в сельском хозяйстве. В аграрном секторе твердые органические отходы после компостирования трансформируются в почву в качестве удобрений. Количество же ТБО, образующихся в городах, породило проблему свалок и полигонов захоронения ТБО и промышленных отходов.

Независимо от метода переработки отходов твердые остатки традиционно ликвидируются с помощью складирования на полигонах. *Полигон* – это комплекс природоохранительного сооружения, предназначенного для складирования, изоляции и обезвреживания твердых отходов. Полигоны и свалки представляют собой техногенные геологические тела, аномально обогащенные органическими компонентами. Полигоны обеспечивают защиту биосферы от загрязнения и препятствуют распространению патогенных микроорганизмов, насекомых и грызунов.

Весь период, начиная с момента выбора площадки под строительство полигона до полной ассимиляции массива отходов окружающей средой, называют жизненным циклом полигона (табл. 10.12).

Таблица 10.12

Этапы жизненного цикла полигона ТБО [73]

| № | Этап | Возраст, годы | Использование объекта |
|---|---|---|---|
| 1 | Инвестиционный | 0–5 | Отвод площадки |
| 2 | Эксплутационный | 5–30 | Полигон ТБО |
| 3 | Рекультивационный | 30–50 | Полигон ТБО |
| 4 | Пострекультивационный | | |
| 4.1 | Активный | 40–60 | Рекреационное. Закрытый полигон ТБО |
| 4.2 | Пассивный | 50–200 | Рекреационное, народнохозяйственное |
| 4.3 | Стабилизационный | 150–500 | Народно-хозяйственное |

На компонентный состав твердых отходов оказывают влияние различные факторы, основные из которых – это географические особенности региона, страна, тип хозяйства, сезон года, практика управления полигоном, мощность захоронения в це-

лом, водный режим.Биохимические процессы разложения ТБО для производства возобновляемой энергии подробно были рассмотрены в гл.6, биокомпостирование рассматривается ниже, в подглаве 10.5.5.

### *10.5.3. Биотехнологии переработки и утилизации отработанных нефтепродуктов*

В настоящее время актуальной задачей являются проблемы рационального использования природных ресурсов, огромное количество которых теряется в виде промышленных отходов, например, шламов нефтяной промышленности, содержащих ценные компоненты – углеводороды.

Сегодня под нефтеотходами подразумеваются не только нефтешламы, но и отработанные масла, замазученные грунты и другие, так как все эти виды отходов (твердые и пастообразные) образуются на предприятиях нефтяной отрасли (рис. 10.10).

Это связано с многоцелевыми функциями корпораций. Так, например, ТОО «Тенгизшевройл» – корпорация, ведущая геологоразведку, разработку, добычу, а также сбыт нефти и сопутствующих продуктов.

В этой связи каждая промплощадка является источником образования отходов, содержащих нефть и нефтепродукты, например: система сбора промысла, товарные парки, насосная, склады реагентов, очистные сооружения, газоперерабатывающий завод и др.

Нефтесодержащие отходы в зависимости от процесса образования являются промышленными отходами 2–3 класса токсичности и основными источниками поступления в окружающую среду, широкого спектра углеводородов: жидких, твердых и газообразных.

Загрязняющие вещества (ЗВ) в нефтеотходах характеризуются высокой растворимостью в воде и летучестью, кроме того, они сами являются растворителями, могут концентрировать другие вещества.

Невысокий процент утилизации по сравнению с накоплением опасных нефтеотходов приводит к отчуждению земельных ресурсов на длительные сроки.

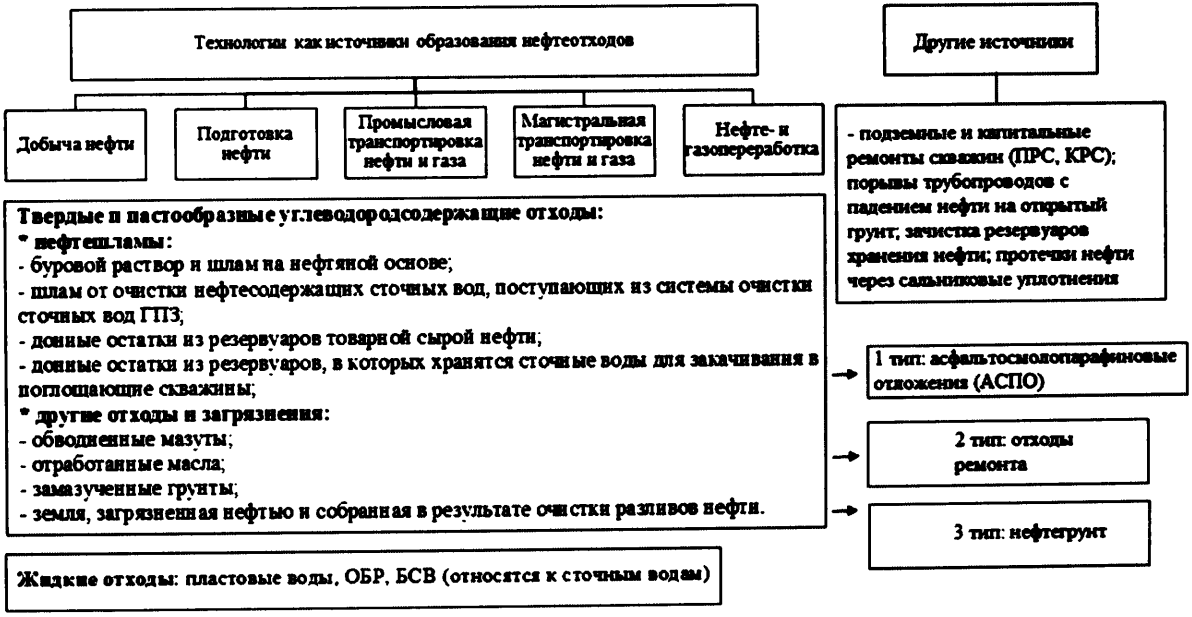



Рис. 10.10. Нефтеотходы различных технологий

В то же время нефтеотходы относятся к вторичным материальным ресурсам и по своему химическому составу могут быть использованы в народном хозяйстве вместо первичного сырья.

Учитывая физико-химические свойства составляющих отходов удобна их классификация, представленная на рис. 10.11. Такое разделение нефтеотходов по типам позволяет разрабатывать локальные способы их утилизации. В соответствии с системой управления отходами сбор и удаление отходов соответствуют требованиям нормативных документов РК: 1) определение источников образования отходов; 2) определение количества образуемых отходов; 3) классификация видов отходов и их категорий опасности; 4) определение потенциальных вариантов сбора и удаления отходов.

Снижение и ликвидацию загрязнения почв и техногенных грунтов нефтью и нефтепродуктами в общем виде возможно направлениями, представленными на рис. 10.12.

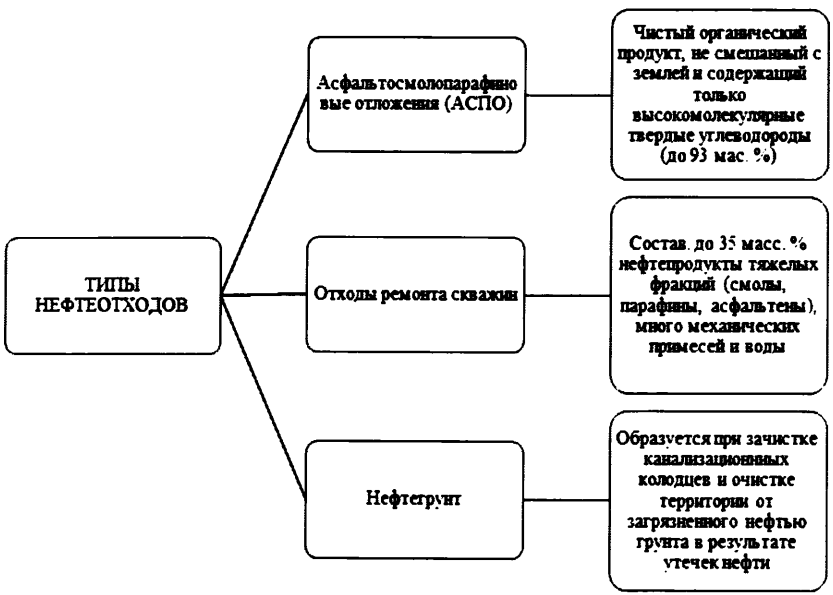



Рис. 10.11. Классификация нефтеотходов по типам




Рис. 10.12. Принципиальные методы снижения и ликвидации загрязнения почв и техногенных грунтов нефтью и нефтепродуктами

Как видно из рисунка 10.12, принципиальные методы снижения и ликвидации загрязнения почв и техногенных грунтов нефтью и нефтепродуктами сводятся к четырем мероприятиям, таким как:

1. *Засыпка нефтезагрязненных участков грунтом* или вывоз загрязненных почв в отвалы применяют в случаях невозможности использовать иные методы.

2. Реальным способом ликвидации загрязнения почв и грунтов нефтью является их *обезвреживание* с последующей засыпкой в котлованах.

3. *Микробиологические методы* применяют, если загрязнен поверхностный слой почвы, при этом одновременно можно вносить минеральные удобрения и рыхлить его.

4. Окончательная стадия *рекультивации загрязненных участков* – посев семян многолетних трав.

Самостоятельную проблему представляет обезвреживание и утилизация нерегенерируемых отходов или *нефтешламов*, которые можно утилизировать способами, представленными на рис. 10.13, показанные в сравнении с распространенной технологией обезвреживания и утилизации регенерируемых нефтьсодержащих отходов и грунтов.

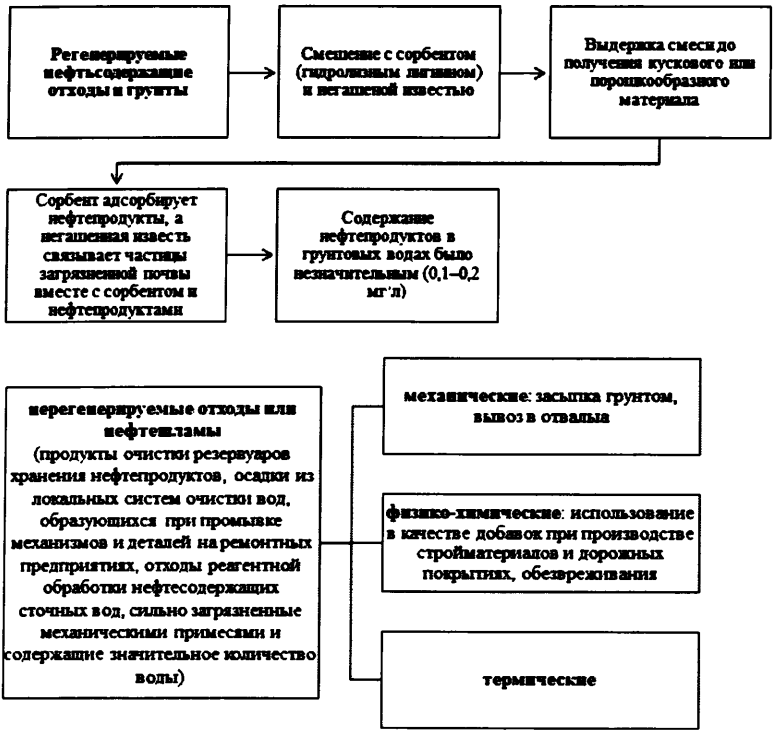



Рис. 10.13. Пример обезвреживания регенерируемых нефтьсодержащих отходов и грунтов, способы утилизации нерегенерируемых нефтешламов

*Утилизация нефтезагрязненных почв* направлена на снижение токсичности химических элементов. Скорость разрушения нефти и очищение поверхности в значительной степени зависят от климата, механического состава, обеспеченности гумусом, элементами минерального питания, стимулирующих жизнедеятельность углеродокисляющих микроорганизмов.

Механический способ очистки нефтезагрязненной поверхности путем сгребания бульдозером замазученной массы и вывоза на полигон имеет недостаток – полностью уничтожается почвенный покров.

Наиболее эффективными являются микробиологические, агрофито-мелиоративные и другие методы очистки почв с использова-

нием полива, адаптированных к местным условиям нефтевыносливых растений, а также качественных сорбентов нефти.

**Обезвреживание и утилизация нефтесодержащих отходов.** Значительную часть жидких нефтесодержащих отходов можно регенерировать с получением нефтепродуктов и возвратом их в производственный цикл.

Нерегенерируемые отходы или нефтешламы (продукты очистки резервуаров хранения нефтепродуктов, осадки из локальных систем очистки вод, образующихся при промывке механизмов и деталей на ремонтных предприятиях, отходы реагентной обработки нефтесодержащих сточных вод, сильно загрязнённые механическими примесями и содержащие значительное количество воды) можно утилизировать следующими способами:механические: засыпка грунтом, вывоз и отвалы;физико-химические: использование в качестве добавок при производстве стройматериалов и дорожных покрытиях, обезвреживания;термические.

При небольших объемах нефтешламов и невозможности сжигания из-за отсутствия специального оборудования их обезвреживают путем добавления связующих (способ обработки сорбентом и смешения с негашеной известью для обезвреживания нефтесодержащих осадков) и захоронения полученных в результате отверждения продуктов.

Нефтешламы являются ограниченно горючими веществами, их сжигание в специальных печах может быть реализовано только при привлечении дополнительного количества топлива. Это рентабельно лишь при значительных объемах шламов и если они постоянно образуются на предприятии, например на нефтеперерабатывающих заводах. Строительство и эксплуатация таких печей экономически нецелесообразно в регионе, где такие заводы отсутствуют, ввиду периодичности образования отходов (при плановой зачистке резервуаров хранения нефтепродуктов и удаления осадков локальной очистке вод), значительного расхода дополнительного топлива, необходимого для поддержания процесса горения, и высокой стоимости таких печей, сравнимой со стоимостью промышленных котлоагрегатов.

Применение на промыслах механического способа очистки нефтезагрязненной поверхности путем сгребания бульдозером

замазученной массы и вывоза на полигон – мероприятие малоэффективное, ведет к полному уничтожению почвенного покрова – основы функционирования биоценоза. Необходимо внедрение на предприятиях нефтедобычи более перспективных биотехнологических, агрофитомелиоративных и других методов очистки почв на фоне полива, использования адаптированных к местным условиям нефтевыносливых растений, а также качественных сорбентов нефти.

В почвах, загрязненных нефтепродуктами, создаются крайне неблагоприятные эдафические условия для жизнедеятельности микроорганизмов, нарушаются режим их азотного и фосфорного питания, интенсивность окислительно – восстановительных и ферментативных процессов. В местах аварийного сжигания нефти и газа генетические горизонты почвы обугливаются и становятся биологически безжизненными.

Деградация и поглощение в профиле загрязненной почвы осуществляется в основном углеводородокислящими микроорганизмами, которые разлагают нефть до конечных продуктов метаболизма – $CO_2$ и $H_2O$.

При этом выделяемая углекислота связывается в карбонатах и воде, кислородные соединения (спирты, кислоты, альдегиды, кетоны и др.) частично растворяются и удаляются из профиля почвы, в остатках образуются твердые корочки высокомолекулярных компонентов нефти.

Высокие летние температуры и ультрафиолетовая радиация территории нефтегазовых промыслов способствют интенсивному биоразложению нефтепродуктов в профиле почв до полного их окисления и минерализации.

В связи с этим микробиологическая утилизация нефтезагрязненных почв основывается на принципе активации к условиям среды местных видов микроорганизмов путем полива, внесения в почву питательных веществ, выделения из почв новых штаммов микроорганизмов.

Разнообразие ферментативных систем, быстрая адаптация к изменяющимся условиям среды делают микрорганизмы способными возвращать в биологический круговорот в безвредной форме продукты углеводородной трансформации, что определяет их ведущую роль в процессе очищения нефтезагрязненных почв.

Известные в мире фирмы «Оксидентал кемикл» (США), «Бейстритент» (Англия), «Биодетокс» (Германия) и др. «Путидойл», «Биоструктор», «Гидробак» успешно используют приемы микробиологической очистки нефтезагрязненной поверхности биоштаммами. Отечественный микробиологический препарат «Мунайбак» утилизирует нефтепродукты почвы и воды на 31–36 %. Эффективными для очищения и восстановления продуктивности почвенного покрова нефтепромыслов являются способы *биомелиорации, использования нефтекоагулянтов, а также фитомелиорации* адаптированным к местным условиям видами растений (полынь, изень, камфоросма, жантак и др. для Прикасия) на фоне удобрения и полива.

Наряду с фитомелиорацией и микробиологическими методами очистки нефтезагрязненых почв на предприятиях нефтедобычи разрабатываются и внедряются *естественные и искусственные сорбенты нефти.*

Для сорбирования нефти широко используются синтетические поглотители типа активированного угля, пенопласта, поглотителей «Ресорб», «Пламилон», гидрофобизированный вспученный перлит, гелеобразователи и различные отвердители. В США разработан препарат из структированного сополимера полиакриламида и бутадиена (25 %), поликарбоксиметил-целлюлозы (25 %), белой сажи (10 %) и полиэлектролита (5 %) в растворенном виде, который эффективно связывает нефтяную жидкость в гелеобразную массу, легко сгребаемую для механической очистки.

Разработан реагент «Биотемпоскрин» (Россия), преобразовывающий углерод нефти и нефтепродуктов в белок. Известен японский препарат, обезвоживающий сырую нефть до трудноразделимой водонефтяной эмульсии, которая легко удаляется путем сжигания. Нефтяные пленки толщиной 1 мм на поверхности удаляются простыми поглотителями из торфа, соломы, древесных стружек и др. Нефтяные отходы (нефтешламы, замазученная почвогрунтом амбарная нефть) используют для *получения асфальтобетонных смесей* в дорожном строительстве.

Перспективным нетрадиционным *мелиорантом нефтезагрязненных почв могут стать бурые угли и шунгиты*, которые являются одновременно эффективными сорбентами токсикантов и углегуминовыми удобрениями почв.

В мировой практике управление отходами основывается на принципе «5RS»: «Reduse» – «Reuse» – «Recycle» – «Recover» – «Residue» (табл. 10.13).

Таблица 10.13

Управление отходами на принципе «5RS» [75–77]

| Управление отходами | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Принцип «Reduse»: | Принцип «Reuse»: | Принцип «Recycle»: | Принцип «Recover»: | Принцип «Residue»: |
| уменьшение количества и токсичности отходов в источнике их образования | повторное использование отходов | переработка отходов, с целью снижения их токсичности | восстановление отходного материала | удаление отхода |

| Применение | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Принцип «Reduse»: | Принцип «Reuse»: | Принцип «Recycle»: | Принцип «Recover»: | Принцип «Residue»: |
| Ликвидация или уменьшение количества образуемых отходов, применяя альтернативные материалы, технологии и методы. | Использование повторно, например, выбуренного шлама для изготовления кирпичей, дорожного покрытия, использование отходящих газов в качестве топлива | Обработка химическими, физическими, биологическими, термическими методами | Восстановление непосредственно в рамках технологического процесса (очистка и восстановление буровых растворов на нефтяной основе для повторного использования, регенерация углеводородов из донных остатков) | Используется, когда исчерпаны все принципы и реальные возможности |

Одним из немаловажных подходов является разделение отходов по физико-химическим свойствам, что облегчит выбор метода по обезвреживанию или удалению. В рамках этих принципов применяются различные методы снижения токсичности, удаления и обработки отходов.

Анализ показал, что на отечественных месторождениях чаще используются методы утилизации нефтеотходов, представленные на рис. 10.14.

Как указано на рисунке 10.14, различают пять методов утилизации нефтеотходов и стоков на отечественных промыслах:

1. Метод нагнетания применяется для закачки сточных вод (СВ), растворов или шламов в подходящие пласты, физически изолированные от подземных источников водоснабжения и не содержащие промышленных запасов нефти и газа.

В настоящее время на месторождениях используются водопоглощающие скважины. Следует отметить, что сточные воды не классифицируются как отходы и им не присваивается класс опасности, для них не разрабатывают проект нормативного размещения на полигонах, соответственно, не разрешается их размещать на полигонах.




Рис. 10.14. Методы утилизации нефтеотходов и стоковна отечественных промыслах

2. Методы термообработки подразумевают: высокотемпературное воздействие на отходы (разрушаются органические компоненты); низкотемпературные способы обработки (обеспечивают восстановление углеводородов и воды). Температурная обработка включает: сжигание в специальных установках, тер-

модесорбцию, сжигание на факеле. Сжигание в факелах является экологически вредным процессом и для снижения парникового эффекта запрещено сжигание попутного газа в факелах.

3. Размещение отходов на полигонах обеспечивает длительную изоляцию окружающей среды от токсичных отходов. В соответствии с Экологическим кодексом РК нормативно размещаемые отходы должны перерабатываться.

4. Захоронение– лучший способ удаления и хранения инертных отходов, не поддающихся переработке, таких, например, как бетонные блоки. Выбор такого метода является вполне логичным применительно и к стабилизированным отходам, так как процесс стабилизации сковывает подвижность компонентов отхода. Обычно этот способ применяют к буровому раствору и шламу на водной основе.

5. Возможно применение нескольких методов биообработки отходов в зависимости от условий площадки для переработки: 1) запахивание отходов в землю; 2) компостирование.

В зависимости от того, где осуществляется биологическая обработка отходов, биотехнологические процессы подразделяются на три вида, представленные в виде табл. 10.15.

Выбор методов обработки и удаления зависит от типа, объема отхода, эффективности и стоимости каждого метода.

В США практикуется очистка нефтезагрязненных грунтов на специально подготовленных площадках или полигонах с использованием биологических методов, которые относятся к зеленым технологиям: покрытие территории (площадки) полиэтиленовой пленкой толщиной 2–3 мм, стыки пленки герметично заваривают; отжим грязного грунта на ленточных фильтр-прессах, центрифугах; распределение отжатого грунта на подготовленной площадке в ряды высотой 20–30 см; перемешивание куч при помощи специальной техники, одновременное внесение готового раствора штаммов микроорганизмов, питательных добавок, ферментов; перемешивание регулярно не реже 1 раз в три дня и внесение биоштаммов, питательных добавок и ферментов.

Таблица 10.15

Виды биотехнологических процессов обработки отходов

| Виды биологической обработки отходов | | |
|---|---|---|
| 1) Технология "in- situ" | 2) Технологии " ex- situ" и " on-situ" | 3) Технология биогенной деструкции нефтесодержащих отходов. |
| биовосстановление загрязненной почвы наместе, путем обычного перемешивания или боронования; технология применима при небольших разливах. При масштабных разливах "in-silu" невозможно, так как концентрация углеводородов токсична для микроорганизмов почвы | позволяют избежать контактирования нефтеотходов с почвой. При этом отход изымается из источника образования и транспортируется на специальные площадки биообработки | Преимущества: биоразложение безопасно для окружающей среды; снижает концентрацию углеводородов в отходах; простой и недорогой способ обезвреживания нефтесодержащих отходов; восстанавливает почву до пригодного для использования состояния; не требует сложного оборудования; предотвращает просачивание нефти в грунтовые воды; предусматривает обработку отходов, а не вывоз их на полигоны для захоронения или сжигания |

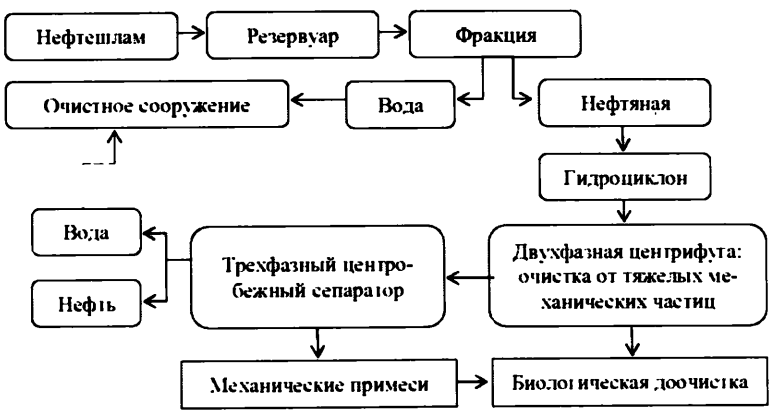



Рис. 10.15. Блок-схема комплексной технологии очистки нефтешламов (шведская фирма «Alfa Laval», 1987 г.)

В мировой практике отсутствуют простые, дешевые методы очистки грунта от нефтепродуктов. Операции по очистке грунтов трудоемкие и требуют применения специальной техники.

Таким образом, для утилизации нефтеотходов необходимо определение потенциальных вариантов сбора и удаления отходов. Наиболее экологичными методами являются низкотермические и биологические. Однако для выбора метода требуются исследования на экологичность технологии и его *технико-экономическое обоснование.*

На рис. 10.15 показана блок-схема биотехнологии очистки нефтешламов.

Представленная блок-схема на рис. 10.15 пригодна только для очистки свежих нефтешламов и неэффективна для очистки донных осадков шламонакопителей.

Для очистки только свежих нефтешламов представлена технология германских исследователей (рис. 10.16) и не предназначена для очистки донных осадков шламонакопителей.

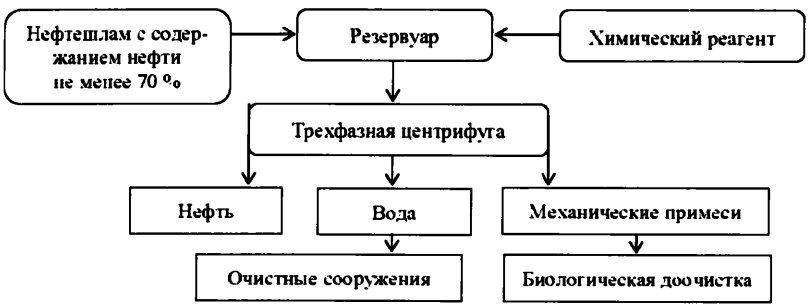



Рис. 10.16. Блок-схема комплексной технологии очистки нефтешлама (Германия, «KHD», 1991 г.)

На рис. 10.17 показана блок-схема по очистке песка от последствий аварийных разливов нефти, например, в Кувейте, разработанная американской фирмой «BogartInvironmentalServices» (1992).

По технологии, представленной на рис. 10.18, остаточное содержание углеводородов в очищенном песке составляет примерно менее 100 мг/кг.

Оборудование и методы очистки, применяемые фирмой «BogartInvironmental Services», успешно работают на тяжелых песчаных грунтах. Но для очистки легких грунтов применение оборудования данной фирмы имеет свои сложности: такой грунт невозможно сформировать в бурты, поэтому на биологию он уходит без отделения свободной нефти, для работы необходимо большое количество чистой воды и резко увеличивается время очистки.

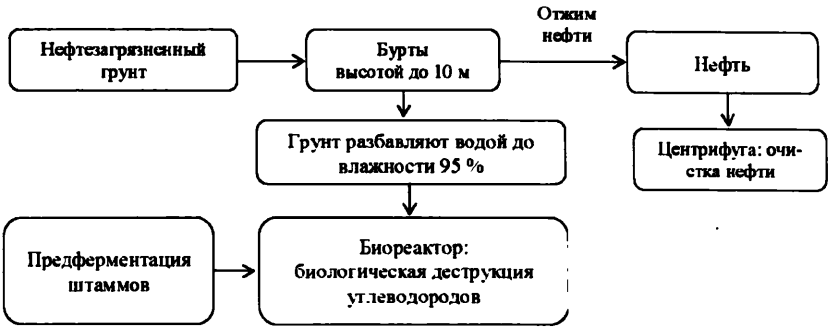



Рис. 10.17.Блок-схема по очистке нефтезагрязненного грунта от последствий аварийных разливов нефти «BogartInvironmental Services»

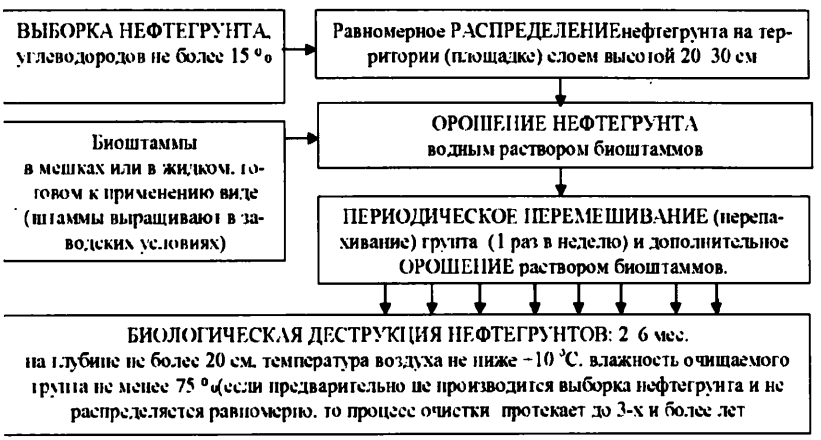



Рис. 10.18. Технология биологической деструкции нефтегрунтов в естественных условиях

В США эффективно применяется очистка отжатых на центрифугах, ленточных фильтр-прессах механических частиц с использованием специально оборудованных полигонов. Ленточные фильтр-прессы являются конкурентом для центрифуг. Однако они позволяют провести лишь отжим грунта от жидкой фазы. С целью повышения степени задержания мелкодисперсных частиц сырье обрабатывают флокулянтом. При этом в отжатом грунте остается 20–30 % углеводородов.

Также разработан биотехнологический метод очистки грунтов биоштаммами в естественных условиях (метод биодеструкции разлитой нефти микробными штаммами – путедойл, деворойл и др.). Биологическая деструкция нефтегрунтов показана на рис. 10.18.

При содержании углеводородов более 15 % метод биодеструкции неэффективен, так как в этом случае требуется дополнительно вносить большие количества биоштаммов; для жизнедеятельности биоштаммов требуется наличие кислорода, поэтому процесс наблюдается только в поверхностном слое грунта на глубине не более 20 см; при температуре воздуха ниже +10 °С биоштаммы практически не работают; влажность очищаемого грунта должна составлять не менее 75 %; территорию, на которой равномерно распределяют очищаемый грунт, с целью предотвращения загрязнения, необходимо покрыть бензомаслостойким герметичным материалом.

**Обработка амбарных нефтешламов**. На сегодня нет совершенных способов обработки и утилизации придонного слоя амбарного нефтешлама (содержание механических примесей в нем достигает 70 %). Для обработки такого вида нефтешлама применение эффективных деэмульгаторов, композиций реагентов, комбинированной технологии недостаточно. Необходимо техническое обеспечение процесса надежными аппаратами-разделителями, гидроциклонами, центрифугами, фильтр-прессами, декантаторами и т. д. Сбор и удаление донных нефтешламов затруднительно из-за больших размеров шламонакопителей и отсутствия надежных заборных устройств.

К донным шламам могут быть применены следующие методы очистки:

– термический – сжигание в печах различного типа и кон-

струкций;

– физический – фильтрование по технологии фирмы «Андриц АГ» (Австрия) на клиновидных фильтр-прессах непрерывного действия;

– химический – метод DSR;

– диспергирование с негашеной известью по технологии фирмы LeoKoncul (Германия) или FestAlpine (Австрия) с использованием оборудования этих фирм;

– биотехнологический – метод разложения с помощью почвенных бактерий при нанесении и запахивании нефтесодержащих остатков в пахотный слой почвы.

На рис. 10.19 показана технологическая схема чешской фирмы DECONTA, основанная на ***биологическом*** методе рекультивации шламонакопителей и очистке нефтезагрязненных земель.

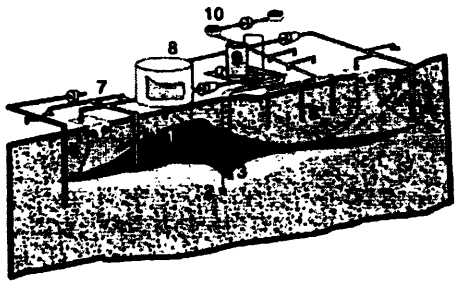



Рис. 10.19. Биотехнологическая ликвидация нефтяных загрязнений фирмы DECONTA (По Мазловой Е. А.):

*1 – первичный очаг загрязнения; 2 – образование депрессии зеркала грунтовой воды, откачка нефтяной фракции с поверхности зеркала; 3 – ассенизационная откачка загрязнителя с зеркала поверхности грунтовой воды; 4 – подпитка породы биопрепаратом; 5 аэрационные скважины (venting); 6 – система аэрации типа «airspearging»; 7 – поглощающие объекты, применение биотехнологии; 8 – биоферментатор, производство биопрепарата; 9 – биоферментатор, обработка откачиваемой загрязненной воды; 10 – фильтры системы аэрации*

В грунт вводятся штаммы бактерий, обладающие большой поверхностной активностью и характерным массивным выделе-

нием ПАВ. В результате освобождаются неполярные вещества в водный экстракт. Пораженный участок промывается биопрепаратом, отработанная вода откачивается и проходит биотехнологическую обработку. Процесс аэрируется с помощью вакуума.

Преимущество метода – непрерывность работы оборудования, помещенного над обрабатываемым участком. Однако, несмотря на очевидные преимущества утилизации шламов, самым доступным методом ликвидации промысловых шламов является захоронение с его обезвреживанием в результате отверждения. Метод отверждения является не только практически доступным, но и экономически выгодным. Так, стоимость обработки 1 т отходов отверждающим составом составляет в среднем от 22 до 30 долл. США.

Достоинством таких отверждающих составов является то, что они превращают отходы бурения в консолидированные массы с высокими прочностными свойствами.

Фирма Chemixcrossfordpollutionservices (Великобритания) рекомендует обрабатывать содержимое амбаров растворимыми силикатами в присутствии коагулянтов. Получаемый при этом камнеподобный материал может быть утилизирован, т. е. использован для дорожного покрытия или безвредно сброшен на поверхность почвы.

Некоторые фирмы предлагают обрабатывать содержимое амбаров специальными активирующими добавками неорганической природы (тампонажный цемент, гипс, жидкое стекло и другие вяжущие), значительно ускоряющими сроки отверждения отходов. После отверждения содержимое амбаров, как правило, засыпают грунтом.

Большинство предлагаемых составов приемлемы для обезвреживания буровых шламов и не решают проблему шламовых амбаров на территории нефтеперерабатывающих и нефтехимических производств.

**Методы комплексной переработки шламов и технико-экономические показатели технологии.** Поскольку не всегда удается достичь одностадийного процесса при обработке шламов, как это было показано ранее, используют комплексные схемы обработки. Зачастую только механические или физико-

химические методы не могут дать эффективного разделения, и, следовательно, обезвреживания из-за высокой стабилизации дисперсии (шлама). При этом отмечается закономерность: чем более продолжительное время хранится шлам, чем более сложные пути его образования, перекачки и транспортировки, тем его стабильность выше. И в таких случаях обычно применяют комплексные схемы переработки, включающие в себя отстаивание, флотацию, дегазацию, кондиционирование, осушку, обработку коагулянтами и флокулянтами, уплотнение, разделение. Заключительными стадиями обработки может быть размещение на специальных полигонах с применением биотехнологий, сжигание, использование в строительстве и других отраслях промышленности.

**Практика очистки грунтов на полигонах.** В США практикуется очистка грунтов на специально подготовленных площадках, полигонах. Технология очистки включает следующие операции:

– территорию (площадку) покрывают полиэтиленовой пленкой толщиной 2–3 мм, стыки пленки герметично заваривают;

– выбирают грязный грунт, отжимают его на ленточных фильтр-прессах, центрифугах;

– отжатый грунт доставляют на подготовленную площадку, распределяют грунт в ряды высотой 20–30 см;

– при помощи специальной техники гряды перемешивают, одновременно вносят готовый раствор штаммов микроорганизмов, питательных добавок, ферментов;

– регулярно, не реже 1 раз в 3 дня, повторяют перемешивание, внесение штаммов микроорганизмов, культуральных субстратов.

Таким образом, в мировой практике отсутствуют простые, дешевые методы очистки грунта от нефтепродуктов. Операции по очистке грунтов трудоемкие и требуют применения специальной техники.

На рис. 10.20 показана схема сепаратора для обработки шламов по технологии «GRIZZLY» с использованием ферментов.

В табл. 10.15 и 10.16 приведены сравнительные характеристики разрабатываемого метода комплексной очистки грунта, нефтепродукта и воды с аналогами.

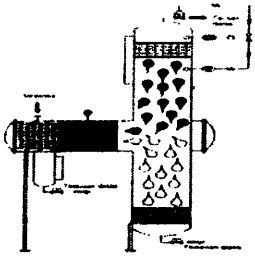


Рис. 10.20. Схема сепаратора для обработки шламов по технологии «GRIZZLY» с использованием ферментов

Таблица 10.15

Основные технико-экономические показатели установок для очистки замазученных грунтов

| Показатели | «Bogart Invironmental Services», США | Очистка грунтов на полигонах | Рекомендуемый метод |
|---|---|---|---|
| 1. Время очистки грунта | 24 ч | 6 мес. | 12 ч |
| 2. Потребляемая мощность, кВт | 320 | 90 | 180 |
| 3. Дополнительно получаемый нефтепродукт на 1 $м^3$ очищаемого гурнта из расчета 50 % концентрации углеводородов в исходном сырье, л | 200 | 200 | 400 |
| 4. Стоимость работ за очистку 1 т грунта, $ | 70 | 40 | 30 |
| 5. Стоимость оборудования, $ | 5 500 000 | 1 200 000 | 600 000 |
| 6. Стоимость подготовки территории, $ | нет | 600 000 | Нет |

На рис. 10.21 представлена блок-схема комплексной биотехнологии очистки грунта от нефтепродуктов, разработанная российскими учеными.

Таблица 10.16

Сравнение технологических характеристик методов очистки замазученных грунтов

| Показатели | «BogartInvironmental-Services», США | Очистка грунтов на полигонах | Рекомендуемый метод |
|---|---|---|---|
| 1. Наименование очищаемого материала: замазученный грунт<br>замазученный песок | Нет<br>Да | Да<br>Да | Да<br>Да |
| 2. Необходимость подготовки площадки | Нет | Да | Нет |
| 3. Наличие очистки грунта в замкнутом объеме (контейнеры) | Да | Нет | Да |
| 4. Необходимое количество контейнеров для обработки 4500 м3 загрязненного грунта | 16 | 4 | 6 |
| 5. Наличие модулей автономного энергообеспечения | Нет | Нет | Да |
| 6. Габариты контейнеров | 2,5x3,0x15,0 | – | 2,5x2,5x8,0 |
| 7. Наличие ступени химикофизической очистки грунта от углеводородов | | | |
| 7.1 Деэмульгация, нагрев, сепарация | Да | Да | Да |
| 7.2 Экстракция, акустическое воздействие | Нет | Нет | Да |
| 7.3 наличие ступени очистки камней, мусора | Нет | Нет | Да |
| 8. Количество углеводородов, подаваемых на биологическую очистку, вес. % | 60 | 80 | 1–2 |
| 9. Наличие ступени биологической очистки грунта | Да | Да | Да |

продолжение табл.10.16

| Показатели | «BogartInvironmental-Services», США | Очистка грунтов на полигонах | Рекомендуемый метод |
|---|---|---|---|
| 10. Выращивание необходимого количества биомассы в процессе выполнения операций | Необходимо дополнительное производство | Необходимо дополнительное производство | Да |
| 11. Необходимость доставки био-массы на обработку в течение всего технологического процесса | Да | Да | Нет |
| 12. Необходимость внесения питательных добавок для повышения эффективности биоштаммов | Да | Да | Нет |
| 13. Коэффициент сокращения количествабиомассы, выгружаемой с очищаемым грунтом | 0,3 | 1,0 | 0,01 |
| 14. Необходимость рекультивации грунтов | Нет | Да | Нет |
| 15. Тип микроорганизмов | Мутанты | Мутанты | Аборигены |
| 16. Степень очистки, мг/кг | 100 | 100 | 100 |

Сущность процесса, показанная на рис. 10.21, заключается в следующем: грязный грунт выбирают бульдозером, экскаватором и загружают в приемное устройство модуля 1. Грунт обрабатывают теплым нефтепродуктом, затем теплой водой с деэмульгатором, отделяют крупные предметы, мусор. Водонефтяную пульпу насосом подают в модуль № 2. Пульпу разделяют на четыре фазы: нефтепродуктовую, водяную, водно-иловую суспензию, тяжелый грунт. Каждая полученная фаза очищается отдельно.

Нефтепродуктовая фаза поступает в модуль № 7 на финишную очистку с применением центрифуги и центробежного

сепаратора. Для повышения степени очистки нефтепродукта применяют, нагрев до 80 С и деэмульгаторы.

Водяную фазу самотеком возвращают в модуль № 1 на создание пульпы и промыв крупных предметов, для лучшей отмывки добавляется деэмульгатор.

Тяжелый грунт выводят конвейером, экстрагируют углеводородным растворителем, отмывают в ультразвуковой ванне и подают в модули № 3, 4 на биологическую деструкцию остаточных углеводородов. В лоток для загрузки грунта в модули № 3, 4 вводят фермент.

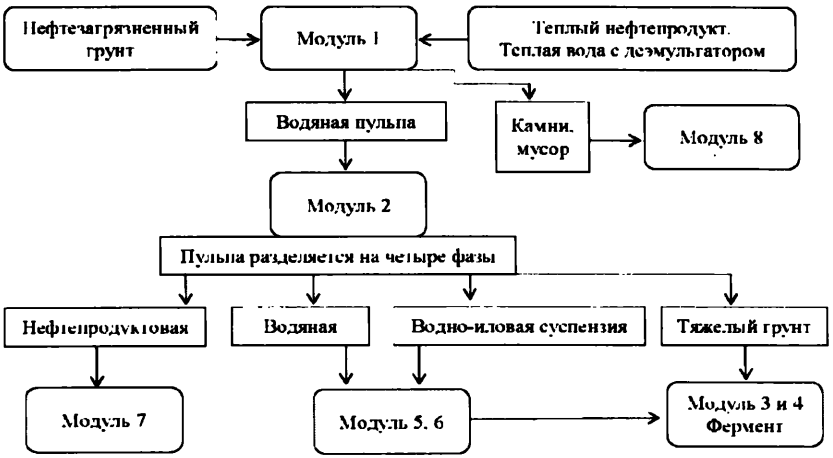



Рис. 10.21. Блок-схема комплексной биотехнологииочистки грунта от нефтепродуктов

Водно-иловую суспензию выводят эрлифтом и подают на биологическую деструкцию углеводородов в воде (модуль 5, 6). Здесь происходит культивирование микроорганизмов. Выращенную на этой стадии биомассу насосом подают в модули № 3, 4 для продолжения процесса биодеструкции тяжелых углеводородных остатков.

Крупные предметы, мусор из модуля №1 по лотку поступают в модуль № 8, где происходит отмыв и биодеструкция углеводородов с поверхности камней и мусора.

### *10.5.4. Закономерности биодеградации углеводородов разных классов в составе нефтеотходов*

В комплексном процессе удаления и обезвреживания нефтесодержащих отходов ведущее положение занимают биологические процессы, решающую роль и которых играют нефтеокисляющие микроорганизмы. В результате многих исследований было показано, что различные по углеводородному составу нефти изменяются под влиянием естественных биоценозов углеводородокисляющих микроорганизмов. Направление процесса окисления нефти зависит от типа нефти, количественного и качественного состава, физиологических групп микроорганизмов в биоценозах и их взаимоотношений.

*Микроорганизмы, усваивающие углеводороды.* Именно в результате деятельности нефтеокисляющих микроорганизмов происходит трансформация углеводородов и неуглеводородных компонентов нефти до простых соединений как углекислый газ и вода, накопление нового органического вещества за счет нарастания биомассы микроорганизмов и тем самым происходит включение углеводородных компонентов загрязнения в общий круговорот углерода.

Большинство видов микроорганизмов, использующих углеводороды перечислены в табл. 10.17, в которой приводится также список углеводородов, подвергающихся микробному разложению.

Скорость использования микроорганизмами углеводородов сильно колеблется. Эти колебания зависят от вида, физиологического состояния организмов, условий среды и начального углеводородного состава разлагаемого материала. К примеру, скорость окисления микроорганизмами нефти равна 7.5 мг/ дц$^2$ поверхности нефти в день. При умеренных климатических условиях тонкие слои нефти на поверхности земли разрушаются бактериями менее чем за 10 дней.

Суммарная деградация нефти протекает по закону мономолекулярной реакций первого порядка:

$C_T = C_O^{-kN}$.

где С и $C_O$ – конечная и начальная концентрация вещества;

Т – время трансформаций;

К – константа скорости реакций, К = ln 2/N;

Таблица 10.17

Таксономический перечень углеводородокисляющих микроорганизмов

| Виды микроорганизмов | Используемые углеводороды | Примечание |
|---|---|---|
| *Род Pseudomonas Вид Ps.aeruginosa* | Нефть, гексан, гептан, нафталин, метан | Многочисленные виды |
| *Ps.fluorescens* | Н-пентан, н-додекан, метилциклогексан, метан | Активна в болотной почве выделена из почвы и канав |
| *Ps.putida* | Алифатические углеводороды | Выделена из масляных эмульсий |
| *Род Methanomonas Вид M.methanica, sp* | Метан, этан, пропан | Выделена из почвы нефтяных промыслов |
| *Род Desulfovibrio Вид D.desulfuricans* | Декан, высшие углеводороды, нефть | Облигатные анаэробы |
| *РодMicrococcaccac Вид M.paraffinae* | Нефть, парафиновый воск | Выделена из садовой почвы |
| *Род Sarcina sp* | Нефть, углеводороды | – |
| *Род Achromobacter Вид A.agile* | Циклогексан, парафин, асфальты, керосин | Усваивает фенол |
| *РодBacterium Вид B.aliphaticum* | Алифатические углеводороды $C_6$-$C_{24}$, гептан, октан, додекан | Не могут усваивать ароматические углеводороды |
| *Вид B.aliphaticum liguefaciens* | Алифатические, нафтеновые, циклогексановые, метилгексановые | – |
| *Вид B.benzoli, вид B.phenanthrenicus, B.napthalinicus* | Бензол, толуол, ксилол, фенантрен, нафталин | Выделена из пропитанной нефтью почвы |
| *Род Bacillus Вид B.hexacarbovorum* | Бензол, толуол, ксилол,парафин | Выделена из почвы, навоза |
| *Род Mycobacterium Вид M.album, M.hyalinicum, M.luterum* | Нефть, парафин, ацетилен | Многочисленные виды, выделены из почвы |

продолжение табл.10.17

| Виды микроорганизмов | Используемые углеводороды | Примечание |
|---|---|---|
| *Род Nocardia. Вид N.opacus, N.minimus, N.actinomorphus* | Парафин, жидкий парафин, додекан, гексадекан, тетрадекан, октадекан | Выделены из почвы |

N – период полураспада вещества.

Микроорганизмы потребляют сначала нормальные парафины, что приводит к относительному увеличению в системе биообработки, содержания разветвленных парафинов и ароматических углеводородов.

Затем происходит перестройка микробного ценоза, после чего начинается предпочтительное использование ароматических и других видов углеводородов. При распаде нефтеуглеводородов, в среде образуются продукты неполного окисления, которые являются субстратом для дальнейшего воздействия микрофлоры. Это спирты, кетоны, жирные кислоты, являющиеся источником энергий для липолитических, протолитических, фенолокисляющих и других видов микроорганизмов, сосуществующие наряду с углеродокисляющими организмами. Поэтому основным типом метаболизма, широко распространенным в микробном мире, является со-окисление или ко-метаболизм. Именно такой тип метаболизма приводит к полной деструкции органических соединений в среде.

### *10.5.5. Биотехнология восстановления отходов*

**Биологическое окисление углеводородов**. Биотехнология восстановления отходов – процесс деструкции органических соединений, присутствующих в отходах разведки и добычи нефти в виде углеводородов до безвредных продуктов таких как $CO_2$ и $H_2O$ с помощью микроорганизмов почвы.

Биодеструкция углеводородов основана на способности микроорганизмов использовать углерод углеводородных соеди-

нений в качестве единственного источника энергии, необходимого для синтеза и роста новых клеток.

Скорость процесса биохимического разложения органических соединении, присутствующих в отходах во многом зависит от количественных и качественных характеристик состава отхода. Некоторые углеводородные соединения легко разлагаются при малых концентрациях, в то время как увеличение концентрации приводит к замедлению скорости процесса разложения, так как большая концентрация некоторых видов углеводородов может ингибировать активность углеводородокисляющих микроорганизмов.

Другие соединения распадаются довольно медленно, требуя определенное время на акклиматизацию микроорганизмов к себе или нуждаются в ко-метаболитах. При высокой концентрации асфальтенов и/или полициклических ароматических углеводородов в отходах, биологический метод может оказаться далеко не лучшим способом быстрого извлечения углеводородной фракций. И наоборот, при высокой концентрации алканов биохимическая очистка довольно эффективна [46, 54, 66, 114]

В целом, подверженность углеводородов к биогенной деструкции убывает в ряду: *предельные углеводороды (парафины) > > ароматические > полярные > асфальтены.*

Для интенсификации биодеградации в отходы добавляют активный ил или биошлам из системы очистки нефтеперерабатывающих предприятий, которые являются прекрасными источниками нефтеразлагающих бактерий.

В зависимости от того, где осуществляется биологическая обработка отходов, биотехнологические процессы подразделяются на три вида (табл.10.18).

Технология биогенной деструкции нефтесодержащих отходов имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами обезвреживания нефтеотходов:

– обработку отходов, а не вывоз их на полигоны для захоронения биологическое разложение органического материала – это естественный процесс, в связи с чем он безопасен окружающей среде.

– снижает концентрацию углеводородов в отходах;

– простой и недорогой способ обезвреживания нефтеотходов;

– восстанавливает почву до пригодного для использования состояния;

– не требует сложного оборудования;

– предотвращает просачивание нефти в грунтовые воды;

–предусматривает сжигания.

Таблица 10.18

Виды биореконструкционных процессов

| Технология *«in- situ»* | Технология *«ex-situ»* | Технология *«on-situ»* |
|---|---|---|
| Технология *«in-situ»*, подразумевает обработку нефтеотходов в источнике их образования. *«In-situ»*-технология . включает биовосстановление загрязненной, при разливах нефти, почвы на месте, путем обычного перемешивания или боронирования. Но эта технология применима в случае небольших разливов. При масштабных же разливах использование *«in-situ»* невозможна, поскольку, в этом случае концентрация углеводородов может быть токсичной для микроорганизмов почвы | Технологии *«ex-situ»* и *«on-situ»* позволяют избежать контактирования нефтеотходов с почвой. Эти технологии подразумевают изъятие отхода из источника образования и транспортирование их на специальные площадки биоообработки | |

**Технология компостирования нефтесодержащих отходов.** Для достижения более высокой скорости реакции биоразложения отходов применяют метод (био)компостирования.

*Биокомпостирование* – это экзотермический процесс биоокисления, в котором органический субстрат подвергается аэробной биодеградации сообществом микроорганизмов в условиях повышенной температуры и влажности с образованием стабильного гумифицированного конечного продукта (табл. 10.19).

Технология компостирования складывается из этапов, показанных на рис. 10.22.

Таблица 10. 19

Характеристика процесса биокомпостирования

| Отходы, подлежащие биокомпостированию | Особенности, характерные для компостирования |
|---|---|
| – буровой раствор и шлам на нефтяной основе;<br>– земля, загрязненная нефтью и собранная в результате очистки разливов нефти;<br>– донные остатки из резервуаров сырой нефти;<br>– донные остатки резервуаров в которых хранятся сточные воды для закачивания в поглощающие скважины;<br>– шлам от очистки нефтесодержащих сточных вод, поступающие из системы очистки сточных вод ГПЗ (газоперерабатывающий завод);<br>– биошлам из системы очистки сточных вод ГПЗ;<br>– органические твердые отходы (например, твердые бытовые отходы, отходы сельского хозяйства) | 1) Сопровождается выделением большого количества тепла.<br>2) Компостирование, процесс четырехступенчатый, управляемый, приводящий к полной редукции отходов. Первые три стадии компостирования протекают быстро и занимают недели, последняя – несколько месяцев.<br>3) Основными условиями компостирования являются:<br>– смешивание отхода с рыхлящим материалом для улучшения условий аэрации, пористости, уменьшения влажности в массе:<br>– стабилизация компоста, достигаемая путем выдерживания компоста;<br>- отделение рыхлящего материала от стабилизированной массы, для повторного использования.<br>4) Процесс представляет собой сложное взаимодействие между органическими составляющими твердых отходов, микроорганизмами (*психрофилы* активны при температуре ниже 20 °С, *мезофилы* – при температуре 20–40 °С и *термофилы* – выше 40 °С), влагой и кислородом.<br>5) Конечным продуктом является компост, который содержит наиболее стабильные органические соединения, продукты распада, биомассу. Компост представляет ценность для сельского хозяйства и как органическое удобрение и как средство, улучшающее структуру почвы |




Рис. 10.22. Блок-схема биотехнологии компостирования органических отходов

Применяют экстенсивный и интенсивный методы компостирования. В первом случае компостирование осуществляют в компостных кучах при длительности несколько месяцев, во втором – в буртах и штабелях с принудительной аэрацией из вентиляторов или перфорированных труб длительностью до 3–4 недель. В реакторах разной конструкции процесс компостирования сокращают до 2-х дней.

Технологические принципы компостирования нефтесодержащих отходов схожи с компостированием органической фракции ТБО (табл. 10.20).

Таблица 10.20

Стадии компостирования органических отходов

| Стадия | Биологические условия | Физико-химические условия | |
|---|---|---|---|
| | | вначале процесса | в середине и конце процесса |
| Мезофильная | Рост мезофильной микрофлоры | Температура на уровне окружающей среды pH – слабокислое | температура около 40 °С, среда подкисляется за счет образования органических кислот |
| Термофильная | Преобладают термофилы, спорообразующие бактерии и актиномицеты, грибы теряют | Постепенное повышение температуры выше 40 °С | pH-среды становится щелочным за счет выделения аммиака при распаде белков |

продолжение табл. 10.20

| Стадия | Биологические условия | Физико-химические условия | |
|---|---|---|---|
| | | вначале процесса | в середине и конце процесса |
| | активность, погибают патогенные микроорганизмы | | |
| Остывание | Активизируются грибы вместе с актиномицетами | pH медленно падает, но остается щелочным | Температура падает до температуры окружающей среды |
| Созревание | Образуются гуминовые кислоты | Стадия характеризуется малой потерей массы и тепла | Компостне разогревается, в нем не происходят анаэробные процессы при хранении, он не отнимает азот у почвыпри внесении нее. pH – слабощелочное |

Параметры, влияющие на скорость получения конечного продукта при компостировании, представлены в табл. 10.21.

Таблица 10.21

Параметры, влияющие на скорость получения конечного продуктапри компостировании

| № п/п | Параметр | Предпочтение |
|---|---|---|
| 1 | Источники питания | Максимум органического и минимум неорганических остатков |
| 2 | Дисперсность частиц | Размер частиц 15–50 мм |
| 3 | Питательные вещества | Отношение углерода к азоту – от 25/1 до 30/1 |

продолжение табл. 10.22

| № п/п | Параметр | Предпочтение |
|---|---|---|
| 4 | Влажность | Оптимальная 50–60 %; вода образуется за счет жизнедеятельности микроорганизмов и теряется за счет испарения |
| 5 | Свободный объем | Компостируемая масса – это трехфазная система: твердая, жидкая и газовая фазы (30 %) |
| 6 | Аэрация | Концентрация кислорода в газовой фазе на уровне 10–18 % |
| 7 | Перемешивание | Позволяет воздуху проникать во все участки компоста, что необходимо для биодеградации |
| 8 | Размеры кучи | Длина любая, высота 1,5 м и ширина 2,5 м при естественной аэрации. В случае принудительной аэрации размеры куч должны препятствовать перегреву |

Из табл. 10.21 следует, что биодеградация органического материала при компостировании приводит к потере примерно 30–40 % органического вещества в виде диоксида углерода и воды. Поэтому масса образующегося компоста меньше массы исходного сырья. В среднем выход компоста составляет от первоначально загруженной массы 40 %.

Рекомендации по компостированию и запахиванию нефтесодержащих отходов представлены в табл. 10.22.

Из табл. 10.22 следует, что компостный материал должен быть рыхлым, воздухопроницаемым, обладать способностью не слеживаться и задерживать влагу. Для этого в отходы добавляются разрыхлители, за счет достижения температур порядка 35–55 °С время обработки при компостировании обычно меньше, чем при других способах биообработки.

Перед процессом запахивания отходов в землю определяют состав отхода и концентрацию нефти в нем (не должен превышать 2–5 %), определяют способность почвы аккумулировать и обрабатывать нефтеотходы, оценивают возможное влияние запахивания отходов на окружающую среду и здоровье людей. Экономнее располагать участки под запахивание непосредственно около источника образования отхода. Отходы с высо-

ким содержанием углеводородов обезвреживают путем облицовки ложе запахивания (метод обработки врезультате которого отходы обезвреживаются и тем самым удаляются).

Компостирование является проверенной технологией снижения концентрации углеводородов в нефтеотходах до безопасного уровня.

Таблица 10.22

Рекомендации по компостированию
и запахиванию нефтесодержащих отходов

| № п/п | Положение | Рекомендация |
|---|---|---|
| 1 | Определение состава отхода | Принятие решение по биообработке |
| 2 | В качестве добавок используется любой рыхлый органический материал (опилки, стружки, солома, навоз, скорлупа) | Рыхлитель должен быть недорогим, доступным в больших количествах, не содержащим примесей, солей. Оптимальное соотношение рыхлый материал / грунт / отход определено как соотношение 2 / 1 / 1 |
| 3 | Потребность в воде зависит от влажности окружающего воздуха, ветра, температуры компоста, степени влажности отхода и способности компоста удерживать влагу | Воду следует добавлять с учетом того, что 12 $м^3$ воды на 765 $м^3$ компоста повышает влажность на 1 %. Для полива используются поверхностные или грунтовые воды. При добавлении воды следует избегать эрозии и смыва компостной смеси |
| 4 | Микробиологический препарат | На грамм отхода должно приходится не менее миллиона КОЕ |
| 5 | Азотные и фосфорные удобрения (мочевина, суперфосфат или фосфат аммония) | Они должны присутствовать в соотношении 14 часть азота : 1 часть фосфора на вес сухого продукта. Для определения расхода удобрения на весь процесс компостирования принимается следующее соотношение: на 100 частей углерода : 10 частей азота : 1 часть фосфора |
| 6 | Размер площадки | Определяется исходя из расчетного количества компостируемой смеси и планируемой длины валков |

продолжение табл. 10.22

| № п/п | Положение | Рекомендация |
|---|---|---|
| 7 | Размер валков | Высота валка не должна превышать 2 м. Оптимальными считается размеры 30 м /2 м / 1,5 м |
| 8 | Участок | Горизонтальный в виде вытянутого прямоугольника, так как при этом достигается максимальная длина валков |
| 9 | Уклон участка | 0,5–1 % для равномерного распределения влаги |
| 10 | Бетонные или асфальтные подстилы | Препятствуют вымыванию составляющих компоста и включению участков почвы в состав компостной смеси |
| 11 | Температура компоста | Измеряют в нескольких точках, учитывая длину валка и на глубине 30–60 см, в течении 30 мин в одной точке. Частота перемешивания, орошения в основном определяется результатами анализа проб |
| 12 | Компостируемая смесь | Перед валкованием должна быть тщательно перемешена с целью образования однородной массы (одинаковый (различия не более 10 %) углеводородный состав) компоста считается однородным |
| 13 | Дополнительные требования к технологии | Определить мероприятия по контролю за летучими углеводородами |

Компостирование можно проводить в виде [75–77]:

– *Компостирования способом валкования* Windrowsmethod). Деградация углеводородов протекает в валках высотой 1,5 м и до 50 м длиной. Микробиологическая активность достигается периодическим переворачиванием валков, для аэраций массы и обеспечения выхода излишки тепла. Валки перемешиваются в среднем один раз в неделю. В зимнее время валки не перемешиваются из-за низкой активности микроорганизмов. Перемешивание производится специальным оборудованием «Scartturner».

– *Компостирование с формированием куч или кип* на специальных управляемых лотках-решетках (Staticpilemethod). Аэра-

ция, контроль влажности, тепла, количества питательных веществ автоматизированы. Продолжительность 30–60 дней.

– *Компостирование в специальных биореакторах* (inVesselmethod). Практическое преимущество этого способа заключается в поддержании скорости деградации на необходимом уровне независимо от условия среды. Такое постоянство обеспечивается высокими температурами внутри реактора, автоматическим управлением содержания кислорода, влажности. Компостирование отходов в реакторе может быть завершена за 30 дней. *«inVessel»* компостирование часто применяется в районах, где климатические условия неблагоприятны для использования способа *«Windrows»*, поскольку низкие температуры, частые дожди замедляют процесс разложения углеводородов.

Компостирование проводится для того, чтобы понизить общую концентрацию углеводородов как минимум до 1 %, которая считается безопасной окружающей среде. Оставшиеся 1 % или менее процентов углеводородов представлены наименее биодеградируемыми углеводородами, так называемыми «тяжелыми» углеводородами, которые окисляются в течении длительного промежутка времени. Группу *«тяжелых»* углеводородов составляют полициклические (не менее 6 колец) ароматические, полярные углеводороды, асфальтены.

При начальной концентрации углеводородов в компостируемой смеси 10–15 % можно достичь снижения количества углеводородов до 2 % за 60 дней. Скорость процесса деструкций углеводородов зависит от ряда факторов:

– углеводородного состава отхода: скорость возрастает в молекулах с прямой углеродной цепью по сравнению с соединениями, имеющие разветленные или кольцевые связи;

– начальной нагрузки на систему биообработки: чем выше начальная концентрация углеводородов в отходе, тем медленнее протекает распад углеводородов;

– физико-химических условий, необходимых для роста микроорганизмов: оптимизация всех необходимых условии в компосте увеличивает скорость биодеструкции углеводородов.

Обработанный отход по завершению компостирования будет представлен в виде готового компоста, продукта безопасного окружающей среде.

Необходимо отметить, что для компостирования характерна сезонность, начинается оно в конце весны и должна быть завершена к октябрю. Средняя продолжительность компостирования составляет 6–8 месяцев. Однако продолжительность процесса определяется скоростью биодеструкции и условиями компостирования.

Компостирование как метод обезвреживания нефтеотходов гораздо эффективнее полей орошения или распределения отходов по земле, поскольку компостируемые отходы все время находятся в пределах одной площадки и их свойства лучше контролируются.

*Маркетинг компоста.* Основными компонентами компоста, произведенных из ТБО являются (в % по сухой массе): органические вещества 30–80; углерод 8–50; азот 0,5–4; фосфор 0,1–2,0; калий 0,5–2,0;кальций 0,8–1,2.

В отличие от компоста на основе ТБО, которые могут использоваться в качестве удобрений в сельском хозяйстве, в силу своих физико-химических характеристик, компост на основе нефтесодержащих отходов в целях предосторожности не рекомендуют применять в качестве добавок в почву в коммерческих или местных хозяйственных целях. Поскольку в нем содержатся, хотя и в незначительных количествах остаточные углеводороды, тяжелые металлы, соли.

Результаты анализа проб готового компоста, полученные на месторождении и приведенные в табл. 10.23, а также сопоставление их с нормами состава и свойств компоста на основе бытовых отходов свидетельствуют об экологической безопасности продукта компостирования нефтесодержащих отходов.

Таблица 10.23

Состав готового компоста на основе нефтесодержащих отходов

| Состав | pH | Содержание, мг/кг | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Нефть, % | | $NO_3$ | $PO_4$ | Ni | V | Zn | Pb | Cu | Cr | Ca | Mg |
| 1 % и менее | 6,5 | 0,01 | – | – | – | 2 | 1,3 | 1 | – | 98 | 30,5 |

Готовый компост на основе нефтесодержащих отходов может быть использован: для выравнивания или заполнения (вариант благоприятен для районов, где существует потребность в чистом наполнителе, исключая закупку чистого наполнителя);часть готового компоста с биомассой повторно (оставлен на месте переработки); в качестве покрытий на полигонах бытового и промышленного отходов; в качестве стабилизатора почв при рекультивации нарушенных земель;для захоронения на полигоне (вариант наименее предпочтителен, так как связан с дополнительными затратами и может повлечь ответственность в соответствии с законодательством).

**Метод запахивания нефтесодержащих отходов.** Запахивание представляет собой регулируемый, физико-химический и биологический процесс, который предполагает контролируемое распределение нефтесодержащих отходов по поверхности земли с определенной степенью нагрузки. При запахивании используется поглощающая способность почвы разлагать и содержать в себе обрабатываемые отходы в верхнем поверхностном слое. Верхний слой почвы, в котором происходит большая часть биологических и химических преобразований и *«иммобилизация»* компонентов отхода, к примеру тяжелых металлов, называется *«зоной ассимиляции»*. Глубина зоны ассимиляции составляет 15–30 см. Та часть почвы, которая лежит ниже и где происходит дополнительная обработка и *«иммобилизация»* элементов получила название зоны обработки. Глубина этой зоны может достигать 1,5 м и является как бы изолирующим барьером, предотвращая просачивание тяжелых металлов и других компонентов отхода в грунтовые воды.

Деструктивная мощность почвы определяется жизнедеятельностью почвенных микроорганизмов, способных разлагать органические соединения и углеводороды, в частности, *запахиванием обезвреживают только не опасные нефтеотходы*, такие, например как, *биошлам*, загрязненный нефтью грунт, шлам из промысловых амбаров и водо-сепарационной системы. Они не содержат большого количества растворимых, токсичных или медленно разлагающихся компонентов, а значит, не будут причиной изменений в почве. Большая часть нефтесодержащих от-

ходов характеризуется сравнительно высоким содержанием твердой фазы.

Отходы доставляются, распространяются и перепахиваются таким образом, чтобы формировать слой почва /отход в 25–30 см с концентрацией углеводородов в этом слое около 5 %. Активный слой перепахивается обычными сельскохозяйственными орудиями с целью смешивания и аэрации почвы после внесения отхода, питательных веществ и орошения. Бронирование обычно надлежит проводить раз в две недели, в течение активного сезона, который длится обычно около шести месяцев. Работа с отходами прекращается в зимнее время, когда слишком холодно для сколько-нибудь значительной биологической активности. При надлежащем управлении, посредством запахивания отходов в землю достигаются цели биообработки как:

1) биологическая деструкция углеводородов до уровня 1 % и менее, который считается безопасным для растений и почвы;

2) ограничивается подвижность тяжелых металлов в зонах ассимиляции и обработки;

3) ограничивается биоаккумуляция некоторых компонентов растениями.

Почва выполняет три важные функций: является средством смешивания отходов, фильтр, предотвращающий поступление загрязняющих веществ в подземные воды, источник микроорганизмов. Некоторые органические и неорганические части отхода становятся физически и химически привязанными к частицам почвы, что и приводит к *«иммобилизации»* компонентов отхода в среде.

Солнечные лучи также участвуют в химической переделке и разложении отхода. Какая-та часть компонентов улетучивается. Однако, чтобы минимизировать большие эммисии в атмосферу, отходы с высоким содержанием летучих соединении должны перепахиваться более глубже, чем это делается обычно.

Поскольку при запахивании биодеструкция осуществляется аэробными микроорганизмами, то система биообработки нуждается в больших количествах кислорода. Кислород кроме того предотвращает появления неблагоприятных запахов. Добиться желаемой концентрации кислорода в почве равной >2 %, можно периодическим боронованием верхнего слоя почвы. Присут-

ствие влаги в почве также весьма существенно для почвенных микроорганизмов и бесспорно то, что микроорганизмы погибнут при низкой влажности системы. Повышенная же влажность безвредна для жизнедеятельности микроорганизмов, но в этом случае подавляется аэробный метаболизм, поскольку показатели концентрации кислорода и содержания влаги обратно пропорциональный. Влажность в системе обработки должна составлять 10–15 % по весу с учетом естественной влажности почвы.

Так как микроорганизмы должны адаптироваться к углеводородному составу отхода как к источнику питания, было бы более эффективно на начальном этапе запахивания применять небольшое количество отхода с концентрацией углеводородов 2–5 %. Адаптация заключается в том, что микроорганизмы начнут вырабатывать энзимы, являющиеся биокатализаторами химических реакции, к предоставленным в качестве источника питания углеводородам, в том случае, если эти углеводороды не привычный для микроорганизмов. Адаптация подразумевает также приспособление микроорганизмов к условиям среды.

Разложение углеводородов часто приводит к окислению почвы, в слишком кислой среде микроорганизмы не будут разлагать отходы достаточно эффективно. Оптимальное pH ограничивает перемещение компонентов отхода в среде. Поэтому важно, чтобы pH среды имела оптимальные значения в пределах 6–8. Для роста и размножения микроорганизмов необходимы азот и фосфор в качестве питательных веществ, в связи с чем почва удобряется по мере истощения среды этими веществами. Приемлемое соотношение азота и фосфора составляет 14/1. Для поддержания концентрации азота на уровне 50–250 мг/кг почвы и фосфора на уровне 25–100 мг/кг, удобрения следует добавлять от одного до трех раз за период обработки отхода. Температура в системе биообработки поддерживается активностью микроорганизмов на уровне 35–50 °С и только при точке замерзания биодеструкция будет равна нулю.

Более чем 100 видов бактерий, дрожжей и грибов, относящиеся к 30 родам известны как углеводородокислящие микроорганизмы. В 1кг почвы содержатся около 13 биллионов микроорганизмов, однако, чтобы биодеструкция протекала на долж-

ном уровне достаточно наличие в почве $10^5$–$10^7$ колонийобразующих клеток/грамм почвы.

Запахивание отходов потребует большие площади, чем компостирование отходов. Размеры участка запахивания зависят от объема отходов и концентраций углеводородов в нем. Участок расчищают, если необходимо локализовать стоки строится берма. В оень влажном климате потребуется дренаж, для предотвращения скопления излишней воды в почве. Подготовленное ложе иногда требует облицовки и может включать подземную дренажную систему в зависимости от нормативного ьстатуса отхода. Образуемый фильтрат обрабатывается в системе очистки сточных вод. В почвы с высокой минерализацией рекомендуется добавлять гипс. Допускается максимальная годовая нагрузка на почву 1000 кг/га общих растворимых солей и 200 кг/га солей натрия.

С 1970 годов метод запахивания отходов привлекает все более повышенное внимание к себе как практический, надежный и экономический метод обезвреживания нефтесодержащих отходов. Существует несколько причин интереса к этому методу:

– запахивание отходов в землю при надлежащем управлений безопасно окружающей среде;

– при запахивании отходы трансформируются в простые биопродукты как углекислый газ и вода, и таким образом отходы становятся со временем не доступными окружающей среде;

– запахивание требует намного меньше энергии, чем допустим работа инсиниратора или химическая обработка отхода;

– затраты на запахивание отхода гораздо небольшие по сравнению с другими методами удаления нефтесодержащих отходов (табл. 10.24).

Участки запахивания, при правильном управлении, могут использоваться в течение долгого времени. Почва не теряет свою деструктивную силу со временем и может адсорбировать вещества в течении промежутка времени. Полигоны для захоронения отходов в отличие от запахивания отходов в определенном смысле сокращают земельные ресурсы, поскольку использование земли из под полигона ограничена. Объяснятся это тем, что при захоронениях отходы разлагаются очень медленно, сохраняясь в почве на десятки лет.

Таблица 10.24

Сравнительная стоимость методов удаления нефтесодержащих отходов

| Методы | $/т | Соотношение стоимости |
|---|---|---|
| Запахивание | 60 | 1 |
| Нагнетание | 50 | 1 |
| Полигоны | 100 | 1,2 |
| Инсинирация | 350 | 2 |

На полигонах в почве из-за отсутствия перемешивания образуются анаэробные условия и связанные с ним образование токсичных жидкостей и дурно пахнущих газообразных веществ. Мониторинг почвы участков запахивания свидетельствует об отсутствии каких-либо признаков опасности и что почва может быть использована, например, в целях рекреаций, строительства. В целях экономии и безопасности участки запахивания иногда размещают около объектов-источников образования отходов. Климатические условия – не самый главный фактор в выборе месторасположения участков под запахивания отходов. Дизайн участка и соответствующее управление – вот основные факторы, более определяющие успех запахивания. На сегодняшний день около 200 объектов по запахиванию действуют в США, половина из которых приходится на нефтяную промышленность. Метод запахивания повсеместно применяется в Канаде, Швеции, Франции, Великобритании, Нидерландах, Финляндии.

Контрольные вопросы

1. Как Вы полагаете, экобиотехнология опирается в большей степени на *«новую»* или *«старую»* биотехнологию?
2. Что подразумевают под биологической активностью окружающей среды?
3. Какие представители микроорганизмов принимают участие в аэробном и анаэробном окислениях органических отходов?

4. Как Вы полагаете, можно ли биотехнологические методы борьбы с органическими отходами совмещать с не биотехнологическими, и если да, то каким образом?

5. Каких условий следует придерживаться при использовании аэробного и анаэробного процессов биодеградации отходов?

6. Охарактеризуйте особенности *«зеленой»* защиты окружающей среды.

## Глоссарий

**Активный ил** – это темно-коричневые хлопья размером до нескольких сотен микрометров, состоят на 70 % из живых организмов и 30% – твердых частиц неорганической природы и представленные микробиологическим сообществом микроорганизмов.

**Аэробное сбраживание** – процесс сбраживания твердых компонентов ила в термофильных условиях при пребывании ила от 3 до 10 суток.

**Биокомпостирование** – это экзотермический процесс биологического окисления, в котором органический субстрат подвергается аэробной биодеградации смешанной популяции микроорганизмов в условиях повышенной температуры и влажности с образованием стабильного гумифицированного конечного продукта.

**Биологически активные вещества (БАВ)** – это высокоактивные биохимические вещества (белки, ферменты, гормоны, антибиотики, витамины), способные в клетке воздействовать на молекулярные преобразования веществ, обеспечить синтез необходимых веществ и изменять скорость обмена веществ.

**Биообъект** (биологический агент) – это важный элемент биотехнологического процесса, обеспечивающий производство возобновляемой биомассы и метаболитов.

**Биореакторы** – это герметические цилиндрические емкости, объемом от 1,0 л (лабораторные: контейнеры, качалки, роллеры, спиннеры) до 500 $м^3$ (промышленные: биореакторы, геобиореакторы), предназначенные для создания благоприятных условий для размножения клеток и синтеза метаболитов.

**Биотехнология** – наука, использующая метаболические свойства живых организмов для производства ценных изделий различного структурного, организационного и функционального уровня.

**Биотопливо** – это альтернативное возобновляемое топливо, производимое из биологического (растительного, животного) или техногенного (органические отходы производства, твердые бытовые отходы) сырья.

**Биоэтанол** (этиловый спирт) – это альтернативное возобновляемое топливо, производится путем каталитической гидратации этилена.

**Векторная ДНК** (вДНК) – это искусственно созданная ДНК-молекула, предназначенная для интеграции чужеродного гена в геном реципиента.

**Диплоидная культура клеток** – это экологически чистая клеточная система, обеспечивающая отсутствие возможных посторонних контаминантов.

**Каллус** – это особый тип ткани растений, образующийся *invitro* в результате неорганизованного и неограниченного роста и представленный скоплениями недифференцированных клеток.

**Клеточная биотехнология** – направление биотехнологии, разрабатывающая на основе биоконструкторских технологий новые биологические программы развития.

**Клеточная линия** (Cellline) – культура клеток, возникающая спонтанно или искусственно из первичной культуры после первого пересева, адаптированная к условиям существования вне организма.

**Клеточная суспензия** – это отделенные от каллуса клетки и клеточные агрегаты, используемые в биотехнологии для получения изолированных протопластов, клеточной биомассы, вторичных метаболитов и клеточной селекции.

**Культивирование** – метод выделения и выращивания клеток в питательной среде для размножения ценных генотипов или производства метаболитов.

**Молекулярная биотехнология** – направление биотехнологии, изуча-ющая информационное содержание гена (генома) и принципы его функционирования для разработки новых генетических программ развития.

**Морфогенезом в культуре каллусных тканей** называют процесс возникновения организованных структур из неорганизованной массы клеток.

**Пассажирование клеток** (субкультивирование) – процесс поддержания жизнеспособности клеток при пересеве на новую свежую питательную среду.

**Первичная культура** – это культура, полученная из ткани и выращиваемая *invitro* до начала субкультивирования (т.е. до первого посева).

**Питательная (культуральная) среда** – это среда, обеспечивающая рост и развитие клеток благодаря оптимальным физико-

химическим условиям и наличию в своем составе компонентов, необходимых для нормальной жизнедеятельности.

**Полигон** – это комплекс природоохранительного сооружения, предназначенного для складирования, изоляции и обезвреживания твердых отходов.

**Постбиотехнологический** – этап получения и реализации целевого биотехнологически произведенного продукта.

**Рекомбинантная ДНК** (рДНК) – это искусственно созданная кольцевая молекула ДНК, в составе которого содержатся ДНК различного происхождения: рДНК = чДНК + вДНК.

**Реципиент** – это организм, получивший генетические детерминанты биотехнологического происхождения (чужеродный ген, рекомбинантную ДНК).

**Субкультуры** – культуры, полученные путем пересева клеток первичных культур в свежую питательную среду.

**Твердые отходы** – это остатки продукций, утратившие свои потребительские свойства в процессе человеческой жизнедеятельности.

**Трансгеноз** – процесс переноса генетической конструкции в биосистеме.

**Чановое биовыщелачивание** – биореакторный процесс извлечения микроорганизмами металлов из концентратов.

**Чистая культура** – однородные популяции микроорганизмов одного определенного вида или штамма.

**Чужеродная ДНК** (чДНК) – это искусственно созданный структурный или регуляторный ген.

**Штамм** – культура микроорганизмов, выделенная из определенного источника.

**Штамм контрольный** – культура, предназначенная для оценки качества вакцинных препаратов.

**Штамм производственный** – культура, предназначенная для производства биопрепаратов.

**Штамм эталонный** – паспортизированная генетически однородная чистая культура.

**Экобиотехнология** –отрасль биотехнологии, направленная на решение экологических проблем по борьбе с загрязнениями окружающей среды.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков. – М.: Мир, 1983.

2. *Айла Ф., Кайгер Дж.* Современная генетика. – В 3-х томах. – М.: Мир, 1988.

3. *Албертс Б., Брей Д. и др.* Молекулярная биология клетки. – В 3-х томах. – М.: Мир, 1994.

4. *Александров А. А., Александров Н. Н., Бородовский М. Ю. и др.* Компьютерный анализ генетических текстов. – М.: Наука, 1990.

5. *Баев А. А.* (отв. редактор). Биотехнология. – М.: Наука, 1984.

6. *Барам Г. И., Грачев С. Л.* Использование перхлората лития при выделении и анализе олиго- и полинуклеотидов // Биоорган. химия, 1985. – Т.11. – С. 1420–1422.

7. *Бауэр Г., Энгельгард Х. и др.* Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. – М.: Мир, 1988.

8. *Безбородов А. М., Загустина Н. А., Попов В. О.* Ферментативные процессы в биотехнологии. – М.: Наука, 2008.

9. *Бейли, Джеймс.* Основы биохимической инженерии: В 2 ч. – Ч. 1 / *Джеймс Э. Бейли, Дэвид Ф. Оллис*; пер. с англ. *А. А. Кирюшкина.* – М.: Мир, 1989. – 692 с.

10. *Бейли, Джеймс.* Основы биохимической инженерии: В 2 ч. – Ч. 2 / *Джеймс Э. Бейли, Дэвид Ф. Оллис*; пер. с англ. *А. А. Кирюшкина.* – М.: Мир, 1989. – 590 с.

11. *Беккер М. Е.* Введение в биотехнологию. – Рига: Пищевая промышленность, 1978.

12. Биология: Пособие для поступающих в вузы / *А. Г. Мустафин, Ф. К. Лагнуев, Н. Г. Быстренина и др.*, под ред. *В. Н. Ярыгина.* – М.: Высшая школа, 2008. – 492 с.

13. Биология: Справочник студента / *А. А. Каменский, А. И. Ким, Л. Л. Великанов и др.* – М.: Физиологическое общество «СЛОВО» ОО Изд-во АСТ», 2006. – 640 с.

14. Биология: Справочник школьника и студента / Под ред. *З. Брема, И. Мейнке.* – М.: Дрофа, 2009. – 400 с.

15. Биотехнология: принципы и применение / Под ред. *И. Хиггинса*; пер. с англ. *А. С. Антонова*; Под ред. *А. А. Баева.* – М.: Мир, 1988. – 479 с.

16. Биохимические основы жизнедеятельности человека: Учеб. пособие / Сост.: *Ю. Б. Филиппович, А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова.* – М.: ВЛАДОС, 2005. – 407 с.

17. *Бирюков В. В.* Основы промышленной биотехнологии. – М.: Колос. Химия, 2004. – 296 с.

18. *Бокуть С. Б.* Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации: Учеб. пособие / *С. Б. Бокуть, Н. В. Герасимович, А. А. Милютин.* – Минск: Высшая школа, 2005. – 463 с.

19. *Брем Г., Кройслих Х., Штрандингер Г.* Экспериментальная генетика в животноводстве. – М.: Россельхозакадемия, 1995.

20. *Валиханова Г. Ж.* Биотехнология растений. – Алматы, 2002.

21. *Вахненко Д. В., Гарнизоненко Т. С., Колесников С. И.* Биология с основами экологии: Учебник для вузов / *Д. В. Вахненко, Т. С. Гарнизоненко, С. И. Колесников.* – Ростов-на-Дону: Феникс, 2009. – 448 с.

22. *Волова, Т. Г.* Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: Электрон. учеб. пособие / *Т. Г. Волова.* – Электрон. дан. (2 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2008.

23. *Воронов Ю. В., Журов В. Н.* Биологические окислители. – М.: МГСУ, 2009. – 103 с.

24. *Гельфанд М. С.* Компьютерный анализ последовательностей ДНК// Молекулярная биология, 1998. – Т. 32. – С. 103–120.

25. *Георгиев Г. П.* Гены высших организмов и их экспрессия. – М.: Наука, 1989.

26. *Гердон Дж., Спандидос Д. и др.* Транскрипция и трансляция. Методы. – М.: Мир, 1987.

27. *Гилберт С.* Биология развития. – М.: Мир, 1993.

28. *Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология. – М.: Мир, 2002.

29. *Гловер Д.* (под ред.). Клонирование ДНК. Методы. – М.: Мир, 1988.

30. *Гловер Д.* (под ред.). Новое в клонировании ДНК. Методы. – М.: Мир, 1989.

31. *Грин Н., Стаут У., Тейлор Д.* Биология / *Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор* / Под ред. *Р. Сопера.* – М.: Мир, 2007. – Т. 1. – 368 с.

32. *Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор;* под ред. *Р. Сопера.* – М.: Мир, 2009. – Т. 2. – 325 с.

33. *Грин Н., Стаут У., Тейлор Д.* Биология / *Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор* / Под ред. *Р. Сопера.* – М.: Мир, 2006. – Т. 3. – 325 с.

34. *Гришин Ю. И., Мандрыка Е. А., Мельникова Н. Е.* Биологическая регенерация веществ. Основные процессы, системы, оборудо-

вание. – М.: У Никитских ворот, 2014. – 496 с.

35. *Гэлстон А., Дэвис П., Сэттер Р.* Жизнь зеленого растения. – М.: Мир, 1983.

36. *Данилюк Н. К., Ястребов С. И. и др.* Упрощенный вариант метода Максама-Гилберта для определения первичной структуры олигонуклеотидов и фрагментов ДНК // Биоорганическая химия, 1986. – Т. 12. – С. 1185–1188.

37. *Дебабов В. Г.* Современные методы создания штаммов микроорганизмов. – М., 1988.

38. *Джамалова Г. А.* Биотехнология животных. – Алматы, 2004. – 328 с.

39. *Джамалова Г. А.* Практикум по биотехнологии животных. – Алматы, 2004. – 268 с.

40. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. – Т.1–3. – М.: Мир, 1982.

41. *Дьяконов Л. П., Ситьков В. И.* (под общ. ред.). Живая клетка в культуре. – М., 2000.

42. *Егорова Т. А.* Основы биотехнологии: Учеб. пособие / *Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина.* – М.: Академия, 2003. – 208 с.

43. *Еликбаев Б. К.* Почва и окружающая среда. Почва и окружающая среда. – Алматы, 2005. – 114 с.

44. *Емцев В. Т.* Агроэкология: основы экологической биотехнологии: учеб. пособие. – М., 2001.

45. *Емцев В. Т.* Рубежи биотехнологии. – М.: Агропромиздат, 1986.

46. *Ершов Ю. А., Зайцева Н. И.* Основы биохимии для инженеров. – М.: Изд-во МГТУ имени Н. Э. Баумана, 2010. – 329 с.

47. *Ершов Ю. А., Щукин С. И.* Основы анализа биотехнологических систем. – М. Изд-во МГТУ, 2011. – 526 с.

48. *Ивчатов А. Л.* Микробиология. – М.: Ассоциация строительных вузов, 2013. – 120 с.

49. *Ивчатов А. Л., Малов В. И.* Химия воды и микробиология: Учебник. – М.: ИНФРА–М, 2014. – 218 с.

50. *Игнатов П. И.* Иммунитет и инфекция: возможности управления. – М.: Время, 2002.

51. *Ильичев В. Д. и др.* Биоповреждения. – М.: Высшая школа, 1987. – 352 с.

52. *Кемп П., Армс К.* Введение в биологию / *П. Кемп, К. Армс.* – М.: Мир, 2008. – 671 с.

53. *Кларк Д., Рассел Л.* Молекулярная биология. – М.: ЗАО «Компания КОНД», 2004.

54. *Кнорре Д. Г., Мызина С. Д.* Биохимическая химия. – М.: Высшая школа, 2000.

55. *Кожевин П. А.* Микробные популяции в природе. – М.: Изд-во МГУ, 1989.

56. *Колешко О. И.* Экология микроорганизмов почвы. – Минск, 1981.

57. *Колчанов Н. А.* (ред.). Компьютерный анализ структуры, функции и эволюции генетических макромолекул. – Новосибирск, 1989. – 282 с.

58. *Коничев А. С.* Молекулярная биология: Учебник / *А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова.* – 2-е изд., испр. – М.: Академия, 2005. – 400 с.

59. *Корнберг А.* Синтез ДНК. – М.: Мир, 1977.

60. *Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д. и др.* Органическая химия нуклеиновых кислот. – М.: Химия, 1970. – 720 с.

61. *Краев А. С.* Простая система клонирования в фаге М13 и секвенирования ДНК с терминаторами // Молекулярная биология, 1988. – Т. 22. – С. 1164–1197.

62. *Ксенофонтов Б. С.* Основы микробиологии и экологической биотехнологии. – М.: Форум. 2015. – 224 с.

63. *Кудрявцев А. Е. и др.* Прикладная экобиотехнология: Учеб. пособие: В 2 т. – 2-е изд. – Т.1. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 629 с.

64. *Кудрявцев А. Е. и др.* Прикладная экобиотехнология: Учеб. пособие: В 2 т. – 2-е изд. – Т. 2. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 485 с.

65. *Лемеза Н. А.* Альгология и микология: Практикум. – Минск: Высшая школа, 2008. – 319 с.

66. *Ленинджер А.* Основы биохимии: В 3 т. – М.: Мир, 1985.

67. *Луканин. В. Н. Промышленно-транспортная экология: Учеб. для вузов / В.Н. Луканин, Ю.В. Трофименко; Под ред. В. Н. Луканина. - М.: Высш. шк., 2003. - 273 с.*

68. *Лысов П. К., Акифьев А. П., Добротина Н. А.* Биология с основами экологии: Учебник / *П. К. Лысов, А. П. Акифьев, Н. А. Добротина.* – М.: Высшая школа, 2007. – 655 с.

69. *Льюин Б.* Гены. – М.: Мир, 1987.

70. *Мазин А. В., Кузнецов А. В., Краев А. С. и др.* Методы молекулярной генетики и генной инженерии. – Новосибирск: Наука, 1990. – 248 с.

71. *Максам А. М., Гилберт У.* Метод определения последовательности ДНК (секвенирования) после введения метки в конец молекулы и

расщепления ее по основаниям // Молекулярная биология, 1986. – Т. 20. – С. 581–637.

72. *Манк М.* (под ред.). Биология развития млекопитающих. Методы. – М., 1990.

73. *Мирный А.Н.* Коммунальная экология. Энциклопедический справочник / Мирный А.Н., Скворцов Л.С., Пупырев Е.И., Корецкий В.Е. – М.: Прима-Пресс-М, 2007. - 806с.

74. *Мудрецова-Висс К. А., Дедюхина В. П.* Микробиология, санитария и гигиена. – М.: Форум – ИНФРА–М, 2014. – 400 с.

75. *Мусина У. Ш.* Технологии основных производств: УМК ДС и силлабус для специальности 050701 «Биотехнология», 2009. – 86 с.

76. *Мусина У. Ш.*Экологические основы технологий основных производств: УМК ДС и силлабус для специальности 050701 «Биотехнология», 2009. – 81 с.

77. *Мусина У. Ш., Васичкин А. С.* Обзор способов утилизации нефтеотходов и технологий их утилизации // Вестн. КазГАСА. – 2014. – № 2(52). – С.133–141.

78. *Мусина У. Ш., Казова Р. А. и др.* «Живая» технология очистки водных экосистем коксускими шунгитами и фитосорбентами // Вестн. КазНТУ. – 2014. – № 3 (103).

79. Нанотехнологии. Азбука для всех / Под ред. *Ю. Д. Третьякова.* – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. – 2-е изд. испр. и доп. – 368 с.

80. Нанотехнологии. Наноматериалы. Наносистемная техника. Мировые достижения / Под ред. *П. П. Мальцева.* – М.: Техносфера, 2008. – 432 с.

81. *Нетрусов А. И.* (под. ред). Экология микроорганизмов. – М., 2004.

82. *Нетрусов А. И.* Биотехнология. – М.: Академия, 2044. – 288 с.

83. *Николайкин Н. И, Николайкина Н. Е., Мелихова О. П.* Экология. – М.: Дрофа, 2005.

84. *Нуркеев С. С., Мусина У. Ш.* Охрана окружающей среды при добыче нефти: Электронный учебник, 2004. – 400 с.

85. *Овчинников Ю. А.* Биоорганическая химия. – М.: Просвещение, 1987.

86. Определитель бактерий Берджи: В 2-х т. – Т.1 / Пер. с англ. / Под ред. *Дж. Хоулта, Н. Крига и др.* – М.: Мир, 1997. – 432 с.

87. Определитель бактерий Берджи: В 2-х т. – Т.2 / Пер. с англ. / Под ред. *Дж. Хоулта, Н. Крига и др.* – М.: Мир, 1997. – 368 с.

88. *Орехов С. Н., Чакалева И. И.* Биотехнология. – М.: Академия, 2014. – 288 с.

89. *Осадчая А. И., Погорский В. С., Семенов В. Ф. и др.* Биотехнологическое использование отходов растениеводства.– Киев: Наукова думка, 1990.

90. *Петров С. В.* Общая хирургия. – Питер, 2002.

91. *Пехов А. П.* Биология с основами экологии: Учеб. пособие для вузов с грифом МО / *А. П. Пехов.* – СПб: Лань, 2007. – 672 с.

92. *Пташне М.* Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг λ. – М.: Мир, 1988.

93. *Пул Ч., Оуэнс Ф.* Нанотехнологии. – М.: Техносфера, 2008. – 336 с.

94. *Рабсон Р.* Основы медицинской иммунологии. – М.: Мир, 2002.

95. *Ридли М.* Геном. – М.: Эксмо, 2008. – 432 с.

96. *Румянцев А. Г.* Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей, 2003.

97. *Рыбчин В. Н.* Основы генетической инженерии. – СПб: СПбГТУ, 2002.

98. *Сампинский Е. М.* Трансляция генетического кода. – СПб: СПбГТУ, 2000.

99. *Самуилов В. Д., Олексин А. В.* Технологическая биоэнергетика. – М: Изд-во МГУ, 1994.

100.*Сассон А.* Биотехнология: свершения и надежды. – М.: Мир, 1987.

101. *Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М.* Определитель патогенных и условно патогенных грибов. – М.: Мир, 2001. – 486 с.

102. *Свердлов Е. Д., Калинина Н. Ф.* Взаимодействие ДНК с перекисью водорода. Метод локализации пиримидиновых оснований в ДНК // Биоорганическая химия, 1983. – Т. 9. – С. 1696–1698.

103. *Сингер М., Берг П.* Гены и геномы: В 2-х т. – М.: Мир, 1998.

104. *Скрябин К. Г., Захарьев В. М., Баев А. А.* Структура внешнего транскрибируемого спейсера рибосомной РНК дрожжей // Докл. АН СССР, 1978. – Т. 241. – С. 488–490.

105. *Смит Д. П.* Нитевидные фаги в качестве клонирующих векторов /, Сельскохозяйственная биология: Векторные системы молекулярного клонирования. – М.: Мир, 1991.

106.*Соколов А. М., Краснова Ю. Т.* Экология и охрана окружающей среды. – М., 1997.

107.*Сухаревич В. И. и др.* Защита от биоповреждений, вызываемых грибами. – СПб, 2009. – 207 с.

108. *Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И.* Практикум по микробиологии. – М.: Дрофа, 2005. – 256 с.

109. *Тутов И. К., Ситьков В. И.* Основы биотехнологии ветеринарных препаратов. – Ставрополь, 1987.

110. *Уолкер Ш.* Биотехнология без тайн. – М., 2008. – 335 с.

111. *Федоров М. Ф.* Почвенная микробиология. – М.: Сов. наука, 1954. – 484 с.

112. *Фогарти В. М.* Микробные ферменты и биотехнология. – М.: Агропромиздат, 1986.

113. *Форстер К. Ф., Дж. Вейза Д. А.* (под ред.). Экологическая биотехнология. – Л.: Химия, Ленинградское отделение, 1990.

114. *Фрайфелдер Д.* Физическая биохимия. Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии. – М.: Мир, 1980.

115. *Фрешни Р.* (под ред.). Культура животных клеток. Методы. – М.: Мир, 1989.

116. *Фролов Ю. П.* Современные методы биохимии / *Ю. П. Фролов*; Самарский гос. унт-т. – Самара: Самарский университет, 2003. – 412 с.

117. *Хефтман Э., Кастер Т. И др.* Хроматография. Практическое приложение метода. – В 2-х ч. – М.: Мир, 1986.

118. *Хиггинс И., Бест Д., Джонс Дж.* Биотехнология: принципы и применение. – М.: Мир, 1988.

119. *Чемерис А. В., Ахунов Э. Д., Вахитов В. А.* Секвенирование ДНК. – М.: Наука, 1999. – 429 с.

120. *Шарипов Г. Л., Казаков В. П., Толстиков Г. Л.* Химия и хемилюминесценция 1, 2-дио-ксетанов. – М.: Наука, 1990. – С. 288.

121. *Шевелуха В. С.* (под ред.). Сельскохозяйственная биотехнология. – М., 2003.

122. *Шлегель Г.* Общая микробиология. – М.: Мир, 1987.

123. *Шмид Р.* Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 325 с.

124. *Щелкунов С. Н.* Генетическая инженерия. Новосибирск, Сибирское университетское издательство, 2004.

125. *Щукин И.* Экология для студентов вузов. Сер. «Шпаргалки». – Ростов н/Д: Феникс, 2004. – 224 с.

126. *Эллиот, Виллъям.* Биохимия и молекулярная биология / Пер. с англ. *О. В. Добрыниной.* – М.: Изд-во НИИ Биомедицинской химии РАМН, 2000. – 372 с.

127. *Эрнст Л. К., Зиновьева Н. А., Бреи Г.* Современнос состояние и перспективы использования трансгенных технологий в животноводстве. – М.: РАСХН, 2002.

128. *Эрнст Л. К., Прокофьев М. И.* Биотехнология сельскохозяйственных животных. – М., 1995.

129. *Якубе Х.-Д., Ешкайт Х.* Аминокислоты. Пептиды. Белки. – М.: Мир, 1985.

130. *Ямщиков В. Ф.* Метод определения последовательности ДНК на твердой фазе // Методы молекулярной генетики и генной инженерии / *А. В. Мазин, А. В. Кузнеделов, А. С. Краев и др.*– Новосибирск: Наука, 1990. – С. 112–115.

131. *Янулайтпис А. А.* Ферменты рестрикции и их применение // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. – Т.17. – М., 1989.

132. *Agelon L.B., Chen T.T.* Supercoiled plasmid sequencing: One buffer for template denatura-tion, primer annealing, and synthesis of labeled strands by reverse transcriptase // Gene Anal. Techn. – 1986.– Vol. 3. – P. 86–89.

133. *Ahmed A.* A simple and rapid procedure for sequencing long (40-kb) DNA fragments // Gene. – 1987. – Vol. 61. – P. 363–372.

134. *Ahmed A.* A vector for sequencing long (40-kb) DNA fragments // Gene. – 1989. – Vol. 75. – P. 315–321.

135. *Ahmed A., Podemski L.* Use of ordered deletions in genome sequencing // Gene. – 1997. – Vol. 197. – P. 367–373.

136. *Akhmetzjanov A. A., Vakhitov V. A.* Molecular cloning and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from Thermus flavus I I Nucl. Acids Res. – 1992. – Vol. 20. – P. 5839.

137. *Allex C. E., Baldwin S. F., Shavlik J. W., Blattner F. R.* Increasing consensus accuracy in DNA fragment assemblies by incorporating fluorescent trace representations // Proc. Fifth Intern. conf. intelligent systems mol. biol. AAAI press. – 1997. – P. 3–14.

138. *Alphey L.* DNA sequencing from experimental methods to bioinformatics. Berlin etc.: BIOS sci. publ. – 1997. – 224 p.

139. *Alting-Mees M. A., Short J. M.* pBluescnpt II: gene mapping vectors // Nucl. Acids Res. – 1989. – Vol. 17. – P. 9194.

140. *Ambrose B J. B., Pless R. C.* DNA sequencing: Chemical methods // Meth. Enzymol. – 1987. – Vol. 152: Guide to molecular cloning techniques. – P. 522–538.

141. Animal biotechnology: science-based concerns The national academies press. Washington, D.C. – 2001. – 182 p.

142. *Ansorge W., Voss H., Zimmermann J.* (ed.). DNA Sequencing strategies. N.Y. etc. Wiley; Spektrum, 1996. 202 p.

143. *Arazi T, R Sunkar, B Kaplan, H Fromm.* A tobacco plasma membrane cal-modulin-binding transporter confers $Ni^{2+}$ tolerance and $Pb^{2+}$ hypersensitivity in transgenic plants. Plant J 20:171–182, 1999.

144. *Arlinghaus H. F., Kwoka M. N., Guo X. O., Jacobson K. B.* Multiplexed DNA sequencing and diagnostics by hybridization with enriched stable isotope labels // Anal. Chem. – 1997. – Vol. 69. – P. 1510–1517.

145. *Austin C. C.* A new method of bipolymerase sequencing prevents "stop-bands" // Mol. Biotechnol. – 1995. – Vol. 4. – P. 100–101.

146. *Azhikina T., Kostina M., Skaptsova N., Potapov V., Berg D., Sverdlov E.* Factors affecting the priming efficiency of short contiguous oligonucleotide strings in the primer walking strategy of DNA sequencing // DNA Sequenc. – 1996. – Vol. 6. – P. 211–216.

147. *Balbas P., Sober on X., Merino E., Zurita M., Lomeli H. H., Valle F., F lores N., Bolivar F.* Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivates - a review // Gene. – 1986. Vol. 50. – P. 3–40.

148. *Bankier A. T., Barrell B. G.* Sequencing single-stranded DNA using the chain-termination method //DNA sequencing: a practical approach / Ed. C.T. Howe, E.S. Ward. Oxford: IRL press. – 1989. – P. 37–78.

149. *Barnes W. M.* DNA sequencing by partial ribosubstitution // J. Mol. Biol. – 1978. – Vol.119. – P. 83–99.

150. *Beck S., Koster H.* Chemiluminescent detection of DNA: Applications of dioxetane chemilu-minescent probes to molecular biology // Anal. Chem. – 1990. – Vol. 62. – P. 2258–2270.

151. *Bellemare G., Potvin C, Simard C.* Chemical DNA sequencing in the opposite direction to the dideoxy chain termination method, using a single preparation of M13 single-stranded DNA // Biochem. Cell. Biol. – 1986. – Vol. 64. – P. 70–72.

152. *Benes V., Hostomsky Z., Arnold L., Paces V.* M13 and pUC vectors with new unique rectric-tion sites for cloning //Gene. – 1993. – Vol. 130. – P. 151–152.

153. *Benson D. A., Boguski M., Lipman D. J., Ostell J.* Ouetlette B.F.F. GenBank // Ibid. – 1998. – Vol. 26. – P.1–7.

154. *Bergeron B., P.* Chan. Biotechnology Industry. A Global, Economic,and Financing Overview. John Wiley & Sons, Inc. – 2004. – 362 p.

155. *Bicknell EJ., Rada R., Davidson S., Stander R.* Mapping from GenBank to MEDLINE // Ibid. 1988. Vol. 16. P. 1667–1680.

156. BJ van der Zaal, LW Neuteboom, JE Pinas, AN Chardonnens, H Schat, JA Verkleij, PJ Hooykaas. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. Plant Physiol 119:1047–1056,

1999.

157. *Blanco L., Bernard A., Salas M.* Evidence favouring the hypothesis of a conserved 3'-5'-exonuclease active site in DNA-dependent DNA polymerases // Gene. – 1992. – Vol. 112. – P. 139–144.

158. *Boland E. J., Pillai A., Odom M. W., Jagadeeswaran P.* Automation of the Maxam-Gilbert chemical sequencing reactions // Ibid. – 1994. – Vol. 16. – P. 1088–1095.

159. *Bolivar F.* Construction and characterization of new vehicles. 3. Derivatives of the plasmid pBR322 carrying unique EcoRl sites for selection of EcoRl generated recombinant DNA molecules // Gene. – 1978. – Vol. 4. – P. 121–136.

160. *Boom D. van den, Ruppert A., Jurinke C, Koster H.* Combined amplification and sequencing in a single reaction using two DNA polymerases with differential incorporation rates for dideoxynu-cleotides // J. Biochem. and Biophys. Meth. – 1997. – Vol. 35. – P. 69–79.

161. *Brosius J.* Superpolylinkers in cloning and expression vectors // DNA. – 1989. – Vol. 8. – P. 759–777.

162. *Bud R.* Biotechnology in the twentieth century. Soc. Stud. Sci. – 1991.

163. *Bud R.* The Uses of Life: a History of Biotechnology. Cambridge University Press. – 1993. Cambridge, United Kingdom.

164. *Burt A., Carter D. A., White T. J., Taylor J. W.* DNA sequencing with arbitrary primer pairs // Mol. Ecol. – 1994. – Vol. 3.– P. 523–525.

165. *Chee M.* Enzymatic multiplex DNA sequencing // Nucl. Acids Res. – 1991. – Vol. 19. – P. 3301–3305.

166. *Chen K., F. H. Arnold.* Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *Bio/Technology* 9. –1991. – P. 1073–1077.

167. *Chretien P., Shen S. H.* Multiplex random priming of internal restriction fragments for DNA sequencing // DNA Cell Biol. – 1992. – Vol. 11. – P. 337–343.

168. *Church G. M., Kieffer-Higgins S.* Multiplex DNA sequencing // Science. – 1988. – Vol. 240. – P. 185–188.

169. *Clark J. M.* Novel non-template nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases // Nucl. Acids Res. – 1988. – Vol. 16. – P. 9677–9686.

170. *Clemens S., Antosiewicz D. M., Ward J. M., Schachtman D. P., Schroeder J. I.*The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 95. – 1998.– P. 12043–12048.

171. *Davies R.W.* DNA sequencing // Gel electrophoresis of nucleic acids: A practical approach. Oxford: IRL press, 1982. – P. 117–172.

172. *Del Sal G., Manifioletti G., Schneider C.* A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing // Nucl. Acids Res. – 1988. – Vol. 16. – P. 9878.

173. *Deng W. P., Nickoloff J. A.* Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* – 1992.200: 81–88.

174. *Dotto G.P., Enea V., Zinder N. D.*Functional analysis of bacteriophage fl intergenic region // Virology. – 1981. – Vol. 114. – P. 46373.

175. *Dunn J. J., Butler-Loffredo L. L., Studier F. W.* Ligation of hexamer on hexamer templates to produce primers for cycle sequencing or the polymerase chain reaction // Anal. Biochem. – 1995. – Vol. 228. – P. 91–100.

176. *Eide D., Broderius M., Fett J., ML Guerinot.* A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 93:5624–5628, 1996.

177. *Fuller C. W.* The effect of excess glycerol on DNA sequencing gels // Editorial Comments. US. Biochem. Corp. – 1989. – Vol. 16. – P. 19.

178. *Gareth M. Evans, Judith C. Furlong.* Environmental Biotechnology.Theory and Application. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester,

179. *Geisselsoder J., F. Witney, P. Yuckenberg.* Efficient site-directed in vitro mutagenesis. *Bio Techniques* 5. – 1987. – 786–791.

180. *Gish G., Eckstein F.* DNA and RNA sequence determination based on phosphorothioate chemistry // Science. – 1988. – Vol. 240. – P. 1520–1522.

181. *Grace E. S.* Biotechnology Unzipped: Promises and Realities Trifolium Press, Inc., 1997. – Toronto, Canada.

182. *Griffin H.G., Griffin A. M. (ed.).* Methods in molecular biology. – Vol. 23. DNA sequencing protocols. Totowa: Humana press, 1993. – 392 p.

183. *Gronenborn B., Messing J.* Methylation of single-stranded DNA in vitro introduces new restriction endonuclease cleavage sites // Nature. – 1978. – Vol. 272. – P. 375–377.

184. *Haugland R. P.* Molecular probes: Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Eugene. – 1992–1994. – 390 p.

185. *Hayashi K.* A cloning vehicle suitable for strand separation // Gene. – 1980. – Vol. 11. – P. 109–115.

186. *Heinrich Klefenz.* Industrial Pharmaceutical Biotechnology. Wiley-VCH. – 2002. – 301 p.

187. *Heller C., Radley E., Khurshid F. A., Beck S.* M13plex vectors for multiplex DNA sequencing //Gene. – 1991. – Vol. 103. – P. 131–132.

188. *Herlitze S., Koenen M.* A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction. *Gene* 91. –1990. – P. 143–147.

189. *Hermes J. D., Parekh S. M., Blacklow S. C., Koster H., Knowles. J. R.* A reliable method for random mutagenesis: the generation of mutant libraries using spiked oligodeoxyri-bonucleotide primers. *Gene* 84. – 1989. – P. 143–151.

190. *Hong G. F.* The use of DNase I, buffer gradient gel, and $^{35}S$ label for DNA sequencing // Meth. Enzymol. – Vol. 155.– 1987. Recombinant DNA. – P. 93–110.

191. *Hou W., Smith L. M.* DNA sequencing with a hexamer string primer and dye-labelled terminators //Anal. Biochem. – 1994. – Vol. 221. – P. 136–141.

192. *Hunter A. G.* Biotechnology in livestock in developing countries, *Proceedings of Biotechnology* 1989, University of Edinburgh, Centre for Tropical Veterinary Medicine, Edingurgh.

193. *Jagadeeswaran P., Kaul R. K.* Use of reverse-phase chromatography in the Maxam-Gilbert method of DNA sequencing: A step toward automation // Gene Anal. Techn. – 1986. – Vol. 3. – P. 79–85.

194. *Johnson A. F., Wang R. J., Chen D.* Purification of single-stranded M13 DNA by cooperative triple-helix-mediated affinity capture // Anal. Biochem. – 1996. – Vol. 234. – P. 83–95.

195. *Kipshidze N. N.* Cardiovascular Cell Transplantation. Taylor & Francis, 2003.

196. *Kirsi-Maria Oksman-Galdentey, Wolfgang H. Barz.* Plant biotechnology and transgenic plants. – New-York, 2002.

197. *Korshunova Y. O., Eide D., Clark W. G., Guerinot M. L., Pakrasi H. B.* The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. Plant Mol Biol 40:37–44, 1999.

198. *Kotler L., Sobolev I., Ulanovsky L.* DNA sequencing: Modular primers for automated walking // Ibid. – 1994. – Vol. 17. – P. 554–558.

199. *Kraft R., Tardiff J., Krauter K. S., Leinwand L. A.* Using mini-prep plasmid DNA for sequencing double stranded templates with sequenase // Biotechniques. – 1988. – Vol. 6. – P. 544–547.

200. *Landt O., GrunertH.-P., Hahn U.* A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* 96. –1990. – 125–128.

201. *Lee J.-S.* Alternative dideoxy sequencing of double-stranded DNA by cyclic reactions using Taq polymerase // DNA Cell Biol. – 1991. – Vol. 10. – P. 67–73.

202. *Ling H. Q., Koch G., Baumlein H., Ganal M. W* .Map-based cloning of chloro-nerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. Proc Natl Acad Sci USA 96. – 1999. – P. 7098–7103.

203. *Lodish H., Berk A., S Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.* New York: W. H. Freeman, 2000. – 968 p.

204. *Mark D. F., Lu S. D., Creasey A. A., Yamamoto R., Lin L. S.* Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81– 1984. – P. 5662–5666.

205. *Marston F. A.* OJ Biochem. – 1986. – 240 p.

206. *Maxam A. M., Gilbert W.* A new method for sequencing DNA // Proc. Nat Acad. Sci. USA. – 1977. – Vol. 74. – P. 560–564.

207. *Michael A. Stroscio, Mitra Dutta.* Biological Nanostructures and Applications of Nanostructures in Biology. Electrical, Mechanical, and Optical Properties. NEW YORK, BOSTON, DORDRECHT, LONDON, MOSCOW. – 2004. – 178.

208. *Nicholas F. M.* Veterinary genetics. Oxford Sciences Publications. Clarendon Press. – 1987.

209. *Nichols R., Dixon J. E.* Rapid identification of clones using the same degenerate oligonucleotide mixture for both screening and sequencing // Anal. Biochem. – 1988. – Vol. 170. – P. 110–115.

210. *Nosoh Y., Sekiguchi T.* 1990. Protein engineering for thermostability. *Trends Biotechnol.* 8: 16–20.

211. *Okano K., Kambara H.* Fragment walking for long DNA sequencing by using a library as small as 16 primers // Gene. – 1996.– Vol. 176. – P. 231–235.

212. *Peden K. W. C.* Revised sequence of the tetracycline-resistance gene of pBR322 // Gene. – 1983. – Vol. 22. – P. 277–280.

213. *Pence N. S., Larsen P. B., Ebbs S. D., Letham D. L., Lasat M. M., Garvin D. F., Eide D., Kochian L. V.* The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/ Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens.* Proc Natl Acad Sci USA 97: 4956–4960, 2000.

214. *Perbal B.* A practical guide to molecular cloning. N.Y. Wiley. – 1984.– 554 p.

215. *Phlllppe Goujon.*From biotechnology to genomes. The Meaning of the Double Helix. – 2001. – 782 p.

216. *Pickering I., Prince R., George M., Smith R., George G., Salt D.*

*E.* Reduction and coordination of arsenic in indian mustard. Plant Physiol 122. – 2000. – P. 1171–1178.

217. *Rosenberg F. M., Ho Y.-S., Shatzman A.*Methods in Enzymology. – 1983. – № 10.

218. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Ibid. – 1977. – Vol. 74. – P. 5463–5467.

219. *Schmoger M. E., Oven M., E.* Grill. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. Plant Physiol 122. – 2000. – P. 793–801,

220. *Shiraishi H., Shimura Y.* A rapid and efficient method for targeted random mutagenesis. *Gene* 64. – 1988. – P. 313–319.

221. *Shuman S.* Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol. 269. – P. 32678–326784.

222. *Smith M.* In vitro mutagenesis. *Annu. Rev. Genet.* 19. – 1985. – P. 423–462.

223. *Tang W,, Liu J.-N., Gurewich V.* Preparation of single-stranded phagemid DNA without chromosomal DNA contamination // Biotechniques. – 1996. – Vol. 21. – P. 53–54.

224. *Thomine S., Wang R., Ward J., Crawford N., Schroeder J. I.* Cadmium and iron transport by members of a plant metal, transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. Proc Natl Acad Sci USA 97:4991–4996, 2000.

225. *Voss H., Nentwich U., Duthie S., Wiemann S., Benes V., Zimmermann J., Ansorge W.*Automated cycle sequencing with Taquenase: protocols for internal labelling, dye primer and "dou-blex" simultaneous sequencing // Biotechniques. – 1997. – Vol. 23. – P. 312–318.

226. *Wang G., Blakesley R. W., Berg D. E., Berg C. M.* pDUAL: A transposon-based cosmid cloning vector for generating nested deleUons and DNA sequencing templates in vivo // Proc. Nat. Acad Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 7874–7878.

227. *Watson N.* A new revision of the sequence of plasmid pBR322 // Gene. – 1988. – Vol 70. – P. 399–403.

228. *Weissman Z., Berdicevsky I., Cavari B. Z., Kornitzer D.* The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. Proc Natl Acad Sci USA 97. – 2000. – 3520–3525.

229. West Sussex PO19 8SQ, England. – 2003. – 285 p.

230. *Wetzel R., Perry L. J., Veilleux C.* Mutations in human interferon gamma affecting inclusion body formation identified by a general immunochemical screen. *Bio/Technology* 9. – 1991. – 731–737.

231. *Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M., Carter P., Winter G.* A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering. *Nature* 307. – 1984. – P. 187–188.

232. *Wooliams J. A., Wilmut I.* Embryo manipulation in cattle breeding and production, Animal Production. – 1989.

233. *Yamakawa H., Ohara O. A.* DNA cycle sequencing reaction that minimizes compressions on automated fluorescent sequencers // Nucl. Acids Res. – 1997. – Vol. 25. – P. 1311–1312.

234. *Zhang H., Scholl R., Browse J., Somerville C.* Double stranded DNA sequencing as a choice for DNA sequencing // Nucl. Acids Res. – 1988. – Vol. 16. – P. 1220.

235. *Zhao H., Eide D.* The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. Proc Natl Acad Sci USA 93. – 1996. – P. 2454–2458,

236. *Zimmermann J., Voss H., Schwager C., Stegemann J., Erfle H., Stucky K., Kristensen T., Ansorge W.* A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing // Nucl. Acids Res. – 1990. – Vol. 18. – P. 1067.

237. *Zoller M. J., Smith M.* Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res.* 10. – 1982. – P. 6487–6500.

## ОГЛАВЛЕНИЕ


| | | |
|---|---|---|
| | ВВЕДЕНИЕ | 3 |
| I. | ИЕРАРХИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ НАУК И ПРОИЗВОДСТВ | 5 |
| 1. | БИОТЕХНОЛОГИЯ – МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНАЯ НАУКА | 5 |
| 1.1. | Биотехнология: предмет и объекты исследования.. | 5 |
| 1.2. | Направления развития и методы биотехнологии.... | 7 |
| 1.2.1. | Биотехнология: сфера науки | 7 |
| 1.2.2. | Биотехнология сфера производства | 16 |
| 1.2.3. | Биотехнология: сфера «зеленой» защиты окружающей среды | 21 |
| 1.3. | Биотехнология и ее связь с другими науками | 25 |
| 1.4. | История развития биотехнологии | 26 |
| 1.5. | Коммерческие аспекты биотехнологии | 27 |
| | Контрольные вопросы | 28 |
| 2. | ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ. | 30 |
| 2.1. | Ферменты рекомбинантного ДНК | 31 |
| 2.2. | Основные этапы работ с ДНК | 38 |
| 2.2.1. | Получение ДНК | 38 |
| 2.2.2. | Построение рестрикционной карты | 39 |
| 2.2.3. | Определение молекулярной структуры ДНК | 40 |
| 2.3. | Основы конструирования рекомбинантной ДНК.. | 47 |
| 2.3.1. | Векторная, чужеродная и рекомбинантная ДНК.. | 47 |
| 2.3.2. | Перенос рДНК из пробирки в клетку | 55 |
| 2.3.3. | Идентификация и отбор клеток с ДНК | 61 |
| 2.3.4. | Клонирование рекомбинантного ДНК | 62 |
| 2.3.5 | Скрининг | 68 |
| 2.3.6. | Синтез полипептидов, кодируемых клонированными сегментами эукариотической ДНК | 68 |
| 2.3.7. | Банк генов и генотипов | 68 |
| 2.4. | Основы конструирования генотипов высших эукариот. | 69 |
| 2.4.1. | Протопластная технология | 70 |
| 2.4.2. | Соматическая гибридизация | 73 |

| | | |
|---|---|---|
| 2.4.3. | Клонирование генотипов растений | 74 |
| 2.4.4. | Конструирование генотипов животных | 78 |
| 2.4.5. | Принципы конструирования трансгенных генотипов. | 84 |
| | Контрольные вопросы | 89 |
| 3. | ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ | 90 |
| 3.1. | Особенности роста клеток в культуре | 92 |
| 3.2. | Питательная среда для культивирования клеток | 93 |
| 3.3. | Типовые приемы и технология культивирования | 98 |
| 3.3.1. | Биореакторы для осуществления биотехнологических процессов | 99 |
| 3.3.2. | Режим культивирования клеток в биореакторах | 103 |
| 3.3.3. | Способы культивирования клеток | 105 |
| 3.3.4. | Методы культивирования клеток | 106 |
| 3.3.5. | Культивирование клеток в зависимости от процесса масштабирования | 108 |
| | Контрольные вопросы | 113 |
| 4. | ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ | 114 |
| 4.1. | Биотехнологическое промышленное производство | 114 |
| 4.2. | Производство биомассы для получения промышленной продукции | 131 |
| | Контрольные вопросы | 144 |
| 5. | ОСНОВЫ ПРОИЗВОДСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ | 145 |
| 5.1. | Основы производства биологически активных веществ в пищевой биотехнологии | 145 |
| 5.2. | Основы производства биологически активных веществ в фармацевтической биотехнологии | 157 |
| | Контрольные вопросы | 171 |
| II. | БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ОТРАСЛЯХ ПРОМЫШЛЕННОСТИ | 172 |
| 6. | БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ | 174 |
| 6.1. | Биотехнология в традиционной энергетике | 174 |
| 6.1.1. | Биотехнология в тепловой энергетике | 174 |

| | | |
|---|---|---|
| 6.1.2. | Биотехнология в гидроэнергетике | 181 |
| 6.1.3. | Биотехнология в атомной энергетике | 183 |
| 6.2. | Биотехнологии в альтернативной возобновляемой энергетике | 186 |
| | Контрольные вопросы | 201 |
| 7. | БИОТЕХНОЛОГИЯ В ГОРНОДОБЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ | 202 |
| 7.1. | Биотехнология удаления метана из угольных пластов | 202 |
| 7.2. | Биотехнология в обессеривании (биодесульфуризации) углей для улучшения их качества | 205 |
| | Контрольные вопросы | 208 |
| 8. | БИОТЕХНОЛОГИЯ В ГОРНО-МЕТАЛЛУРГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ | 209 |
| 8.1. | Общие понятия | 209 |
| 8.2. | Продуценты-микроорганизмы, используемые в биотехнологии извлечения металлов и технологические параметры процесса | 211 |
| 8.3. | Бактериальное выщелачивание из минерального сырья металлов | 214 |
| 8.4. | Бактериальное выщелачивание куч и отвалов | 220 |
| 8.5. | Бактериальное выщелачивание руды in situ | 225 |
| 8.6. | Характеристика биометаллургических технологий переработки руд и концентратов меди, золота | 230 |
| 8.7. | Кучное и подземное выщелачивание химическим и бактериальным выщелачиванием | 233 |
| | Контрольные вопросы | 235 |
| 9. | БИОТЕХНОЛОГИЯ В МАШИНОСТРОЕНИИ, НЕФТЕДОБЫВАЮЩЕЙ, ХИМИЧЕСКОЙ И ДРУГИХ ОТРАСЛЯХ ПРОМЫШЛЕННОСТИ | 236 |
| 9.1. | Биотехнология в машиностроении | 236 |
| 9.2. | Биотехнология в нефтедобывающей промышленности | 242 |
| 9.3. | Биотехнология в химической и других отраслях промышленности (строительство, легкая промышленность на примере кожевенного производства) | 243 |
| | Контрольные вопросы | 249 |

10. БИОТЕХНОЛОГИЯ: СФЕРА «ЗЕЛЕНОЙ» ЗАЩИТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ..... 251
10.1. Направления и задачи применения биотехнологии для охраны окружающей среды ..... 251
10.2. Биодеградация ксенобиотиков ..... 254
10.3. Биотехнология защиты атмосферы ..... 256
10.4. Биотехнология защиты гидросферы ..... 259
10.4.1. Аэробный способ очистки сточных вод ..... 262
10.4.2. Анаэробный способ очистки сточных вод ..... 263
10.4.3. Сырой активный ил ..... 268
10.5. Биотехнология защиты литосферы ..... 270
10.5.1. Биотехнология очистки и восстановления почв .... 270
10.5.2 Принципы биотехнологии переработки отходов ... 274
10.5.3. Биотехнологии переработки и утилизации отработанных нефтепродуктов ..... 277
10.5.4. Закономерности биодеградации углеводородов разных классов в составе нефтеотходов ..... 299
10.5.5. Биотехнология восстановления отходов ..... 301
Контрольные вопросы ..... 316
ГЛОССАРИЙ ..... 318
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК ..... 321

Учебное издание

Джамалова Гуля Абаевна
Мусина Умут Шайхисламовна
Еликбаев Бахытжан Кошкинбаевич

# ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ
(для технических вузов)

Учебное пособие

Нач. РО УИЦ *З. А. Губайдулина*
Редактор *З. А. Губайдулина*
Компьютерная верстка *А. Б. Аршнова*

Подписано в печать 25.09.2015 г.
Тираж 300 экз. Формат 60x84x 1/16. Бумага типографская № 1.
Уч.-изд.л. 21,3. Усл. п.л. 19,8. Заказ № 534. Цена договорная.

Издание Казахского национального исследовательского
технического университета им. К. И. Сатпаева
Учебно-издательский центр КазНИТУ,
г. Алматы, ул. Сатпаева, 22